

修 士 学 位 論 文

題 名

細胞治療に向けた低侵襲かつ高効率遺伝子導入
を可能とする電氣的細胞操作に関する研究

指導教員

小原弘道 准教授

平成 29年 1月 19日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科

機械工学 専攻

学修番号 16883325

氏 名 前 島 達

目次

一章 序論

- 1.1 細胞治療
- 1.2 遺伝子導入手法
- 1.3 電氣的細胞操作
- 1.4 研究目的

二章 理論

- 2.1 誘電泳動
- 2.2 交流電気浸透流
- 2.3 エレクトロポレーション

三章 実験装置および方法

- 3.1 実験装置概要
 - 3.1.1 細胞操作部
 - 3.1.2 電場印加部
 - 3.1.3 観察及び撮影部
 - 3.1.4 画像計測システム
- 3.2 試料
- 3.3 実験方法及び実験方法
 - 3.3.1 交流電場下における細胞への影響検証実験
 - 3.3.2 細胞操作分離評価実験
 - 3.3.3 交流電気浸透流評価実験
 - 3.3.4 局所エレクトロポレーション実験

四章 実験結果および考察

4.1 交流電場下における細胞への影響

4.1.1 印可電場による細胞膨張

4.1.2 印可電場強度及び印可周波数の影響

4.2 細胞分離操作評価

4.2.1 生死細胞選別印可周波数の算出

4.2.2 生死細胞分離評価

4.2.3 分離操作可能範囲

4.3 交流電気浸透流

4.3.1 誘起流による粒子挙動

4.3.2 拡散速度との比較

4.3 局所エレクトロポレーション

4.3.1 導入効率及び生存率

4.3.2 従来導入法との導入効率及び生存率の比較

4.4.3 蛍光導入の様相

4.4.4 蛍光導入位置

4.4.5 細胞円周部の開孔部率

4.4.6 物質輸送による導入促進効果

5 章 結論

参考文献

一章 緒論

1.1 細胞治療

近年、医学分野では、薬の代わりに細胞を用いて疾患を治療する細胞治療(Cell Therapy)の実現に向け精力的に臨床と研究が進められている。細胞治療とは、自身の細胞もしくは他人の細胞を用いて様々な疾患を治療する治療法である⁽¹⁾。者から細胞や組織を取り出し、それらを体外で培養による増量や機能を高めるといった処理を行った後に、再び元の体内に戻す手段を取る。

細胞治療は様々な目的に合わせて分類されており、それらを Table1.1.1 に示す。細胞移植の分野では、2013年に国立成育医療研究センターにおいて、先天的な肝臓疾患を有する新生児の治療として国内初の肝細胞移植治療が行われ⁽²⁾、肝細胞のみならず免疫細胞など今後さらなる細胞移植治療が行われていくことが期待されている。自身の免疫応答に働く細胞を移植することで最も副作用の少ない癌治療法が可能であるとされている。

将来的にはこれらの細胞治療に用いる細胞に対して、遺伝子導入による形質転換⁽³⁾を行い、機能を高めた細胞を治療に使用することで効果的を飛躍的に向上させる期待がある⁽⁴⁾。

Table.1.1.1 Cell therapy classified

細胞治療名	治療方法	具体例
再生医療	機能不全に陥った臓器や組織を再生・回復させる治療	心筋シート（自己細胞培養）
遺伝子治療 細胞移植治療	疾病の治療を目的として遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与する治療	免疫細胞治療 iPS 細胞移植 肝細胞移植 造血細胞移植

1.2細胞内物質導入法

細胞内物質導入法とは細胞内に遺伝物質を導入し遺伝子改変を行う技術であり，主に遺伝子機能やタンパク質機能を研究するための分析に用いられてきた．近年では細胞に機能を発現させて治療に用いる細胞治療の際に，発現させる遺伝物質を細胞内に導入する技術として有用であると期待されている．細胞内物質導入法には大きく分けて3種類の方法がある．1. 化学的方法 2.生物学的方法 3.物理方法であり，各々に特徴があるために目的により使い分ける必要がある．(Table1.2.1)

以降では，各導入手法の詳細と本研究で使用するエレクトロポレーションについて詳しく記す．

Table.1.2.1 Gene injection classified⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾

手法	方法	代表例
生物学的	ウイルスを媒介し 細胞内へ導入	アデノウイルス
化学的	エンドサイトーシスを利用し細胞内へ導入	DEAE-デキストラン
物理的	物理的ツールを用いて 直接的に細胞内へ導入	マイクロインジェクション法
		パーティクル・ガン法
		エレクトロポレーション法

I. 化学的方法⁽⁵⁾⁽⁶⁾

化学的方法とは外来遺伝子を哺乳類細胞に導入するために最初に使用された物質導入手法である。導入効率は細胞の種類や導入因子によって異なるものの、比較的低い細胞傷害性、突然変異誘発性という利点を有する。化学的トランスフェクション法は、現代の研究において最も広く用いられている方法であり、細胞特異性を改善するために利用されてきた。科学的方法の代表例であるリポフェクション法の原理は、負の電荷を持つ DNA の周りに正の電荷を持つ陽イオン性リポソームが結合し複合体を形成して、エンドサイトーシス現象により細胞表面から細胞内に遺伝子を取り込まれる。簡便に導入が行える点で遺伝子分析の学問では有用であるが、化学物質による細胞への毒性の懸念を抱える為、治療用の細胞導入には不適であると考えられている。

II. 生物学的方法⁽⁷⁾⁽⁸⁾

生物学的方法とはウイルスが持つ病原性に関する遺伝子を取り除き、外来の目的遺伝子を組み込んだウイルスベクターを用いて細胞内へ導入する手法である。物理的、化学的遺伝子導入法と比較して遺伝子導入効率は高く、なおかつ遺伝物質を長期間発現させることもできる利点を持つ。アデノウイルスをはじめとする遺伝子導入用のウイルスの中でも比較的安全性の高いと考えられるレンチウイルスを用いた遺伝子導入技術に期待があり、導入効率が非常に高く、導入できる細胞の種類も幅広いことから、実験室レベルでの細胞の評価では最も有効なベクターの一つとして利用されている。一方で欠点は、免疫原性および細胞傷害性である。ウイルスベクターの導入は炎症反応や挿入変異を引き起こす

可能性があり，腫瘍遺伝子の活性化，必須遺伝子の遮断等の恐れがある．実際に，アデノウイルスベクターによりオルニチントランスカルバルミラーゼ遺伝子治療を受けた患者が，アデノウイルスベクターの冠動脈内投与後，呼吸困難と多臓器不全により死亡した報告がなされている．

III. 物理的方法⁽⁷⁾

物理的手法とは遺伝物質を物理的ツールを用いて導入する手法である．この手法には，マイクロピペットを用いて遺伝物質を細胞質または核に直接注入するマイクロインジェクション法，遺伝物質を付着させた微小金属粒子を弾丸として高速射入して細胞内に導入するパーティクル・ガン法，細胞に高電圧パルスを印加することで細胞膜に小孔を一過的に形成し物質を導入するエレクトロポレーション法等が代表例として挙げられる．しかしながら，物理的な刺激を与える為，細胞を損傷することも多く，細胞治療のような安全面が重視される治療には不適とされてきた．現在では，この物理的物質導入法の侵襲性の高さを克服する改良に多くの研究が進められている．

● エレクトロポレーション

1972 年, Zimmermann らにより, 赤血球の懸濁液に外部より適当な電場強度を与えると, 膜の透過性が一過的に上がることが見いだされ, この現象は赤血球への物質導入に応用された⁽⁹⁾ その後, Neumann らはこの現象を動物細胞の遺伝子導入に初めて適用した⁽¹⁰⁾. 細胞懸濁液に外部より電場を与えると細胞膜には電場強度の大きさに応じた力が加わり, 細胞には 膜貫通電位 (TMP: transmembrane potential) が誘発され, 総膜貫通電位がある閾値 $\sim 0.5\text{V}$ の臨界値に達すると, 細胞膜が透過性になり不透過性分子の輸送が可能となる⁽¹¹⁾. 脂質二重層の分子動力学シミュレーションによれば, ナノメートルサイズの水性細孔がパルス適用中に脂質二重層の内部に形成される⁽¹²⁾.

パルス振幅, パルス持続時間, パルス形状, パルス数および繰り返し周波数などを適当にすることで, 小孔のサイズを大きくすること, 小孔持続時間を長くすることが可能とされており, 物質導入効率を向上させることが可能となっている⁽¹³⁾. しかし現状のエレクトロポレーション技術では高導入効率を得ようとする電場条件では, 高電場強度を必要とする為に細胞へ高負荷がかかり, 多数の細胞が細胞死に至る. この導入効率と細胞死亡率の二律背反の関係がエレクトロポレーションの大きな課題となっている.

近年では様々な角度からのアプローチにより課題克服を目指す研究が取り組まれている. 導入ステップに着目し, 電場を用いて導入物質を微動させる電気泳動法を用いて導入効率を向上させた研究が注目を集め, この導入システムは BIORAD 社のエレクトロポレータにも採用されている. この技術のように, 導入物質が小孔を通じて細胞内へ導入される際に, 拡散現象のみならず外力によって導入を促進する機構は導入効率を飛躍的に向上させる期待がある.

また, 多数の細胞に対してではなく, 特定の細胞への単一細胞エレクトロポレ

ーションにより低侵襲に導入を行う研究も存在する。Lee らは多細胞へのエレクトロポレーションの場合、数百万の細胞全てに対して膜貫通電位を与えようとすると単一細胞に必要な電場強度以上の高電圧を必要としている点を指摘した。Lee らの研究成果では、多細胞でのエレクトロポレーションは単一細胞エレクトロポレーションと比較してトランスフェクション率および細胞生存率が低下することを明らかにした⁽¹⁴⁾。

導入効率に課題を抱えるエレクトロポレーションだが多くの強みも持っている。特に、非常に操作が簡便であり、高度な熟練した技術は必要がない点、一度の遺伝子導入操作で 10^8 個以上の大量の細胞を処理できる点が他の導入法と比較しても非常に優れている。それ故に課題を克服されることが待望されている技術でもある。

1.2 電氣的細胞操作

細胞治療法において使用する細胞を識別，摘出する操作の確立が必要とされている．現在の細胞を識別，摘出技術には，蛍光色素や磁気ビーズによって細胞を標識して識別，摘出する FACS(Fluorescent-Activated Cell Sorting) や MACS(Magnetic-Activated Cell Sorting)が既存の技術として存在し，近年では精度の高い識別，摘出が可能になっている．しかしながら，これらの技術では標識のための蛍光色素，磁気ビーズの生体に対する安全性の問題をかかえており，細胞治療においては化学的な標識を必要としない細胞識別技術の必要性が高まっている⁽¹⁵⁾．これらの背景より，化学的な標識を使用せず細胞を識別，摘出可能とする電氣的細胞操作が安全性の観点から注目を集めている．電氣的細胞操作手法とは，細胞や流体に対して電氣的に作用する様々な現象として知られる Electrokinetics⁽¹⁶⁾を利用して細胞を操作する手法のことであり，なかでも誘電率の違いを利用し細胞の識別と分離を可能とする誘電泳動法に期待が寄せられており，多くの研究がなされてきている．

誘電泳動とは，不均一交流電界下におかれた溶液中の物質に誘電泳動力 (Dielectrophoretic Force : DEP Force)が生じることで移動する現象であり⁽¹⁷⁾，1951年に Pohl によって報告された⁽¹⁸⁾．誘電泳動は液体中に存在する双極子に対して働く力であり，液体中に存在する荷電粒子に働く電気泳動とは異なる．電気泳動は粒子の持つ電荷に比例した力を受けるのに対し，誘電泳動は電場勾配にしたがって力が働く．よって電気泳動は電荷を持つものしか動かすことができないが，誘電泳動は細胞のような電荷を持たない粒子でも操作することができる．この現象は電極の形状および電圧，周波数を変化することで，任意の物質を分離・同定が可能であり，細胞を調べるための方法として有効な手段と期待されている．1979年に Pohl らによって異種細胞の分別⁽¹⁹⁾の可能性が示され，近年

では誘電泳動により捕集した大腸菌や酵母のインピーダンス計測値から、その代謝状態を間接的に評価する応用技術も報告されており⁽²⁰⁾、多くの細胞操作を一つのユニットで行える迅速性及び簡便性の可能性を秘めている技術であると言える。しかし電流による細胞へダメージや電極への非特異的接着など解決すべき課題も多く抱えており、多くの研究者が細胞治療の現場で使われる技術を目指し、低侵襲細胞操作が可能な誘電泳動法の開発に取り組んでいる。

電氣的細胞操作における誘電泳動誘起時、Electrokinetics の 1 種である交流電気浸透流(AC Electro-osmosis Flow : ACEO Flow)が生じる。交流電気浸透流とは、流体に交流電場を印加した際に電極表面での流体の緩和特性によって誘起される流れであり、電極の形状および印加電圧、周波数、導電率を変化させることで、微小領域に流れを誘起可能である⁽²¹⁾。この交流電気浸透流により局所的に形成されるせん断流や対流は混合や粒子の誘導に効果的であり、細胞操作への応用も期待されている。このような微小領域に形成される流動は、先駆的な研究にはじまる平面平板電極群近傍に形成される流動に着目した研究⁽²²⁾やこれらを応用した DNA や CNT、微粒子などのマニピュレーション⁽²³⁾に関する研究はなされているものの、応用・適用範囲の広い三次元的な棒状電極に着目した研究はなされておらず、棒状電極周りに誘起される交流電気浸透流の特性を明らかにし、細胞や DNA のハンドリングに応用する研究が求められている。

1.4 研究目的

1.2 章で述べたように細胞治療に用いられる細胞には安全が第一に求められる。しかしながら、現在はウイルスベクターを用いた細胞への遺伝子導入を使用することが主流であり、導入細胞を選別するために蛍光ラベルを使用する等、安全が懸念される治療法となってしまうている。一連の細胞操作を安全に行える技術が確立されれば、細胞治療は積極的に医療の現場で使用されていくはずである。特に、細胞内への物理的物質導入法であるエレクトロポレーション法の侵襲性と導入効率の二点が充分に向上する技術が求められている。そこで先鋭電極による細胞の電氣的胞操作技術とエレクトロポレーションを統合利用する新たな細胞操作技術に期待がある(Fig.1.4.1 参照)。この技術により、先鋭電極に印加する電場の周波数条件を変化させるのみで、細胞の捕捉や分離、細胞内に導入する因子の誘導、遺伝子を導入するためのエレクトロポレーションを行え、細胞治療に必要な 3 つの細胞操作が迅速かつ簡易的に可能であると考えられる。さらに先鋭電極により誘起される局所電場エレクトロポレーションは電場を細胞の一点に集中させられるため、必要最低限な電場印可で膜穿孔が行える低侵襲性が期待され、交流電気浸透流を物質輸送に活用することで、物質の小孔内導入を促進し高効率な遺伝子導入が期待される。しかしながら、誘電泳動及び交流電気浸透流と局所電場エレクトロポレーションを統合利用する技術に関する研究はされていない。

そこで本研究では先鋭電極により誘起される不均一電場を用いた電氣的細胞操作により、細胞治療に実用化される高導入効率かつ安全な物質導入手法確立を目指し、以下の事柄について検討する。

1. 交流電場下における細胞への影響
2. 選択的細胞選別操作となる誘電泳動法の評価

3. 物質輸送が期待される交流電気浸透流の流動評価
4. 局所電場エレクトロポレーションの評価及び従来手法との比較
5. 局所電場エレクトロポレーションと交流電気浸透流による物質輸送を統合
利用する物質導入の有用性

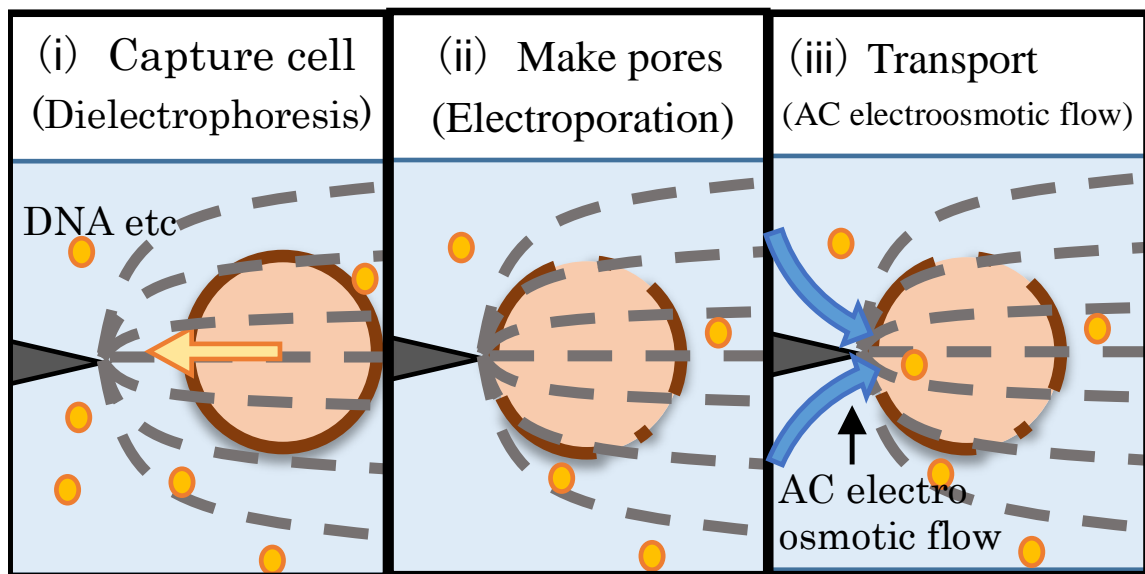


Fig1.4.1 My cell manipulation in three steps

二章 理論

2.1 誘電泳動⁽²⁴⁾

誘電泳動では力が電場の二乗に比例するため、電気力をより局在的に分布させることが可能であり、さまざまな分野への応用が検討されている。誘電泳動の特徴は、次のようにまとめられる。

- ①電場が非一様の場合にのみ力が生じる
- ②力の向きは電場の極性によらない
- ③流体の誘電率と粒子の誘電率の大小関係で力の向きが定まる
- ④直径が $1\mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 程度の粒子に用いられることが多い

一般的な誘電泳動力の導出過程を以下に示す

誘電体に電場を与えると双極子を発現する。双極子が均一電界 E 内に置かれると、正および負の電荷に Fig.2.1.1 のような力 $F=qE$ が生じる。これらの力の大きさは互いに等しく向きは反対であるため双極子に力は生じない。

一方、双極子を不均一電界 E 内に置いた場合、二つの電荷に Fig.2.1.2 に示すような力が生じる。正電荷 $+q$ が位置 \mathbf{r}_+ に、負電荷 $-q$ が同 \mathbf{r}_- にあるとすると、それぞれの電荷にはたらくクーロン力 F_+, F_- はそれぞれ、電場ベクトル \mathbf{E} を用いて

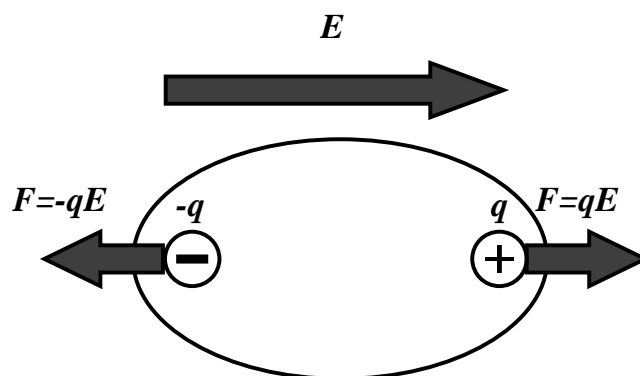


Figure.2.1.1 Forces generated in dipoles with uniform electric field

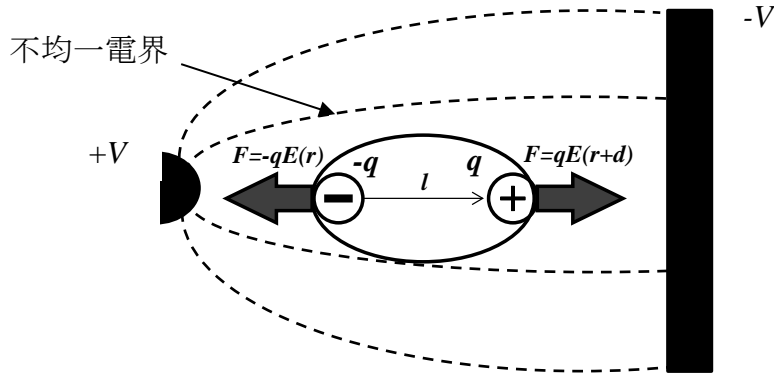


Figure.2.1.2 Forces generated in dipoles with non-uniform electric field

$$\mathbf{F}_+ = q\mathbf{E}_{(r_+)}, \quad \mathbf{F}_- = -q\mathbf{E}_{(r_-)}$$

と表現される．ここで， $\mathbf{r}_+ = \mathbf{r}_- + \mathbf{l}$ とにおいて， $\mathbf{E}_{(r_+)}$ をテイラー展開すると，

$$\mathbf{E}_{(r_+)} = \mathbf{E}_{(r_-)} + (\mathbf{l} \cdot \nabla)\mathbf{E} + (\text{高次項})$$

これより，誘電体全体にはたらく正味のクーロン力(=誘電泳動力)は，以下のようになる．

$$\mathbf{F}_{dep} = \mathbf{F}_- + \mathbf{F}_+ = q(\mathbf{E}_{(r_+)} - \mathbf{E}_{(r_-)}) = q(\mathbf{l} \cdot \nabla)\mathbf{E}$$

ただし，高次項は無視した．ここでこの式をベクトル変形すると，

$$\mathbf{F}_{dep} = (q\mathbf{l} \cdot \nabla)\mathbf{E} = \nabla(q\mathbf{l} \cdot \mathbf{E}) - (\mathbf{E} \cdot \nabla)q\mathbf{l} - q\mathbf{l} \times (\nabla \times \mathbf{E}) - \mathbf{E} \times (\nabla \times q\mathbf{l})$$

$\nabla \times \mathbf{E} = 0$ であるため，

$$\mathbf{F}_{dep} = \nabla(q\mathbf{l} \cdot \mathbf{E}) - (\mathbf{E} \cdot \nabla)q\mathbf{l}$$

ここで，双極子モーメント $\mathbf{p} = V\alpha\mathbf{E} = q\mathbf{l}$ より，

$$\mathbf{F}_{dep} = V\alpha(\mathbf{E} \cdot \nabla)\mathbf{E} = \frac{1}{2}V\alpha\nabla|\mathbf{E}|^2 \quad (2.2.1)$$

この式を分析すると，誘電泳動力は以下のように分解できる．

(誘電泳動力) = (粒子の体積) × (誘電体の分極率) × (電場強度) × (電場勾配)

上記で与えられた一般的な誘電泳動力 \mathbf{F}_{dep} の式に体積 $V = (4\pi(d_p/2)^3)/3$ を代入する．また，分極率 α については，クラウジウスーモソッティ関係式を用いることで求めることができる．

$$\alpha = 3\varepsilon_m \text{Re}[K^*(\omega)]$$

ただし,

$$K^*(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}, \quad \varepsilon^* = \varepsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \quad (2.2.2)$$

よって, 粒子に働く誘電泳動力は以下のようなになる.

$$\mathbf{F}_{dep} = 2\pi(d_p/2)^3 \varepsilon_m \text{Re}[K^*(\omega)] \nabla |\mathbf{E}|^2 \quad (2.2.3)$$

誘電泳動力が働いたときの粒子の動きを Fig.2.1.3 に示す. Fig.2.1.4 に示すようにクラウジウス-モソッティ関数 $\text{Re}[K^*(\omega)]$ の正負によって誘電体の泳動方向は変わる. 高電場強度の方へ泳動する現象を正の誘電泳動と呼び, 高電場強度とは逆方向へ泳動する現象を負の誘電泳動と呼ぶ. またクラウジウスモソッティ関数は周波数に依存しており, 適当な印可周波数に合わせることで誘電体の分離を行え, その力は電場強度により調節することが可能である.

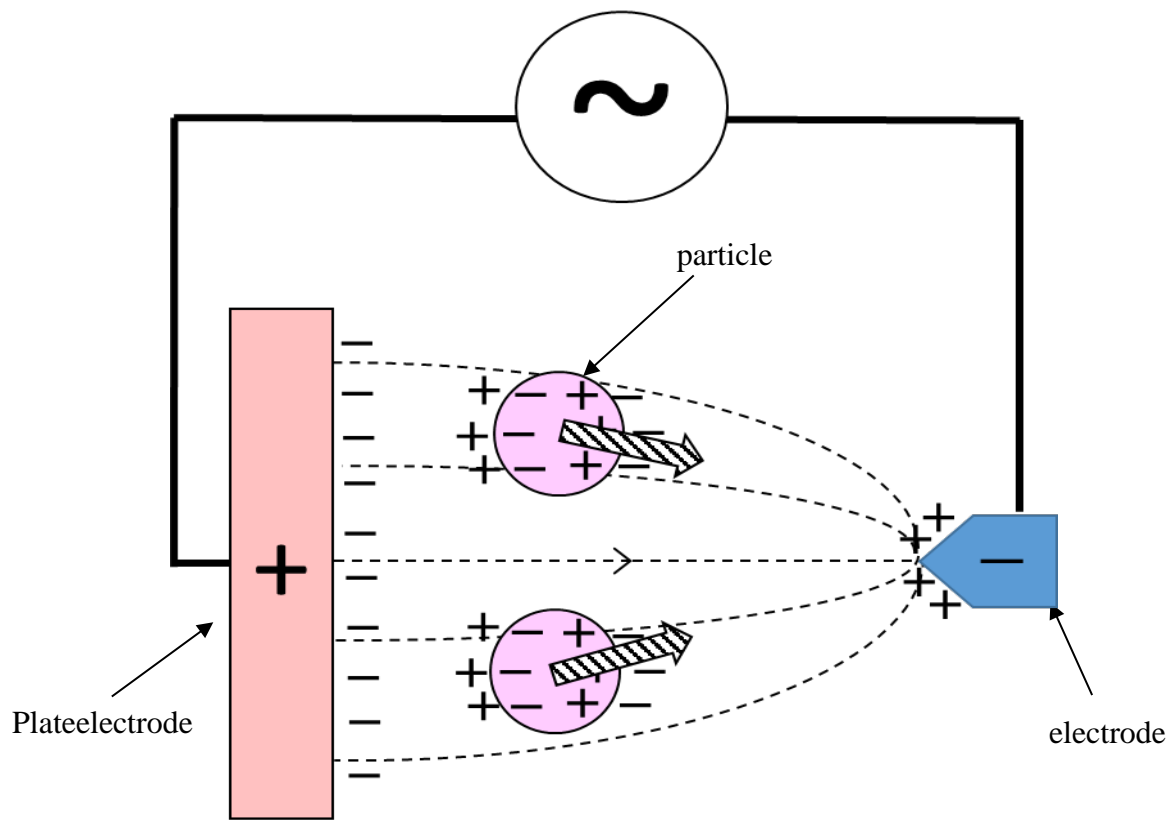


Figure.2.1.3 Particle motion in $K^* > 0$

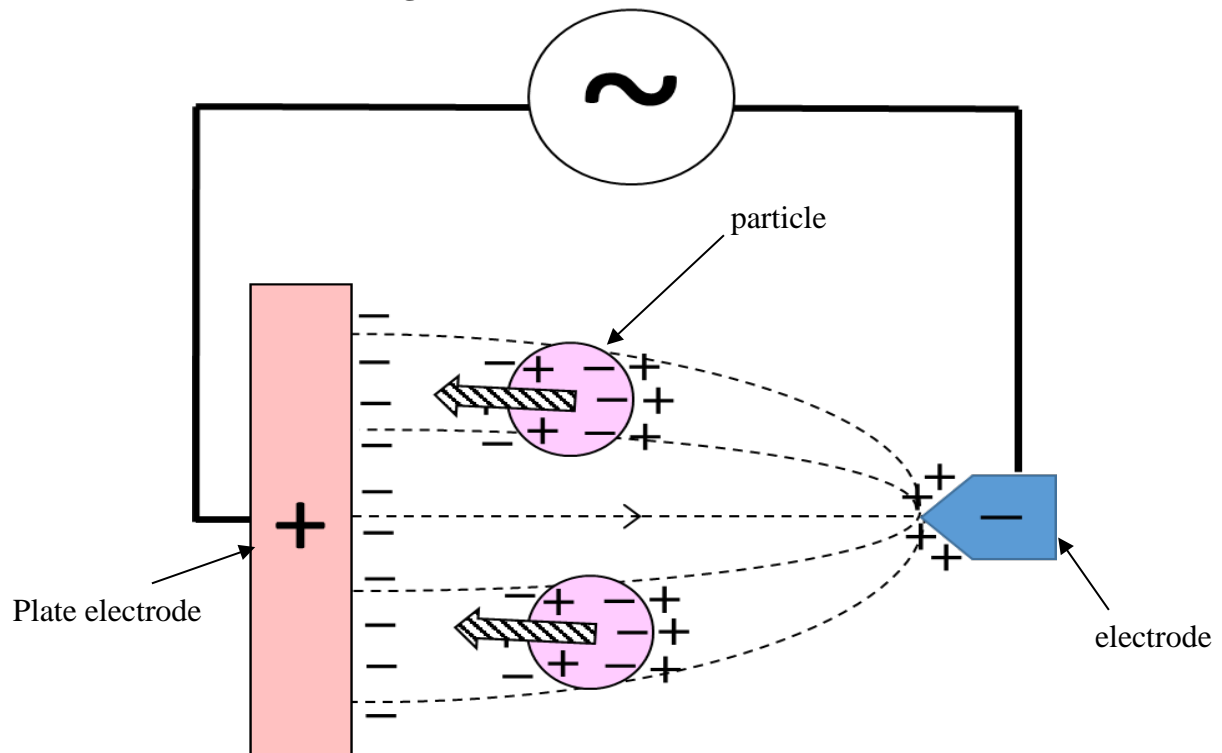


Figure.2.1.4 Particle motion in $K^* < 0$

2.2 交流電気浸透流⁽²¹⁾

Electrokinetics で、電圧を生み出す平板電極によって印加電場と周波数に依存した速度を持つ流動を生み出すことが知られている．流体に交流電場を印加した際に電極表面で生じる電気二重層に電界によるクーロン力が作用し、流体の緩和特性によって誘起される流れである．平板電極による交流電気浸透流の概略図を Fig2.3.1⁽²¹⁾に示す．

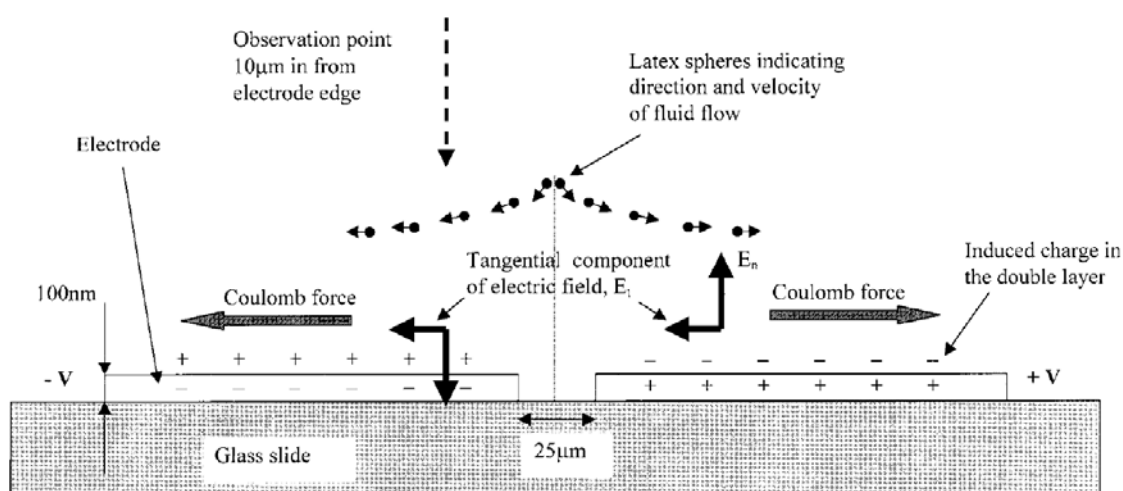


Figure.2.2.1 Diagram illustrating a cross-section of the microelectrode used to measure particle velocities.

一般的に水溶液と接する固体または液体の界面は、電荷を帯びている．この電荷による電場は、溶液側から反対符号のイオン（対イオン）を引き寄せ、表面近傍に電気二重層(Fig.2.2.2²⁵⁾)を形成する．電極表面近傍の固定的な電荷の集まりから成る極めて薄い Stern 層およびその外側の拡散層から成る電気二重層が形成され、電位 ϕ の分布が生じる．Stern 層と拡散層の境界での電位はゼータ電位 ζ と呼ばれ、電気二重層の厚さは Debye 長 λ_D として表される．この電気二重層に電界を印加することで、クーロン力により荷電粒子が移動し粘性効果によりバルク全体が流動し交流電気浸透流となる．

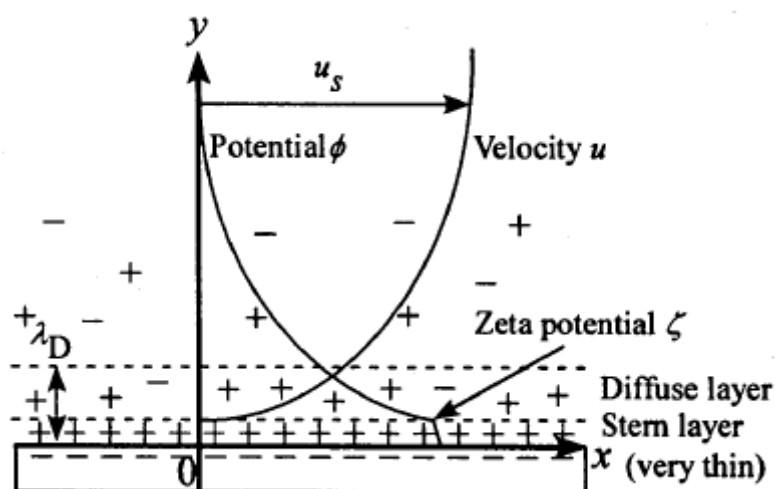


Figure.2.2.2 Electric double layer

まず電気二重層の厚さを導くため拡散電気移住層内の電位分布を導く.

平らな荷電界面の一方に濃度 $C[\text{mol/l}]$ の電解質の水溶液があるとき, 正負イオンの数密度が $n[\text{m}^{-3}]$ であると仮定すると

$$n = 10^3 \times C N_A$$

ただし N_A はアボガドロ数である.

Gouy - Chapman モデルより拡散層内 ϕ にポアソン方程式を仮定する.

$$\frac{d^2 \phi}{dy^2} = - \frac{\rho(y)}{\epsilon_r \epsilon_0}$$

拡散内の電荷密度 $\rho(y)$ は次の式で表される.

$$\rho(y) = v e n_+(y) - v e n_-(y)$$

ここで温度 T のとき, イオンのボルツマン分布を仮定すると

$$n_+(y) = n \exp\left(-\frac{v e \phi(y)}{k_B T}\right)$$

$$n_-(y) = n \exp\left(\frac{v e \phi(y)}{k_B T}\right)$$

ただし k_B はボルツマン定数である.

以上のことから拡散電気二重層の電位分布の式は

$$\frac{d^2\varphi}{dy^2} = -\frac{ven}{\varepsilon_r\varepsilon_0} \left[\exp\left(-\frac{ve\varphi(y)}{k_B T}\right) - \exp\left(\frac{ve\varphi(y)}{k_B T}\right) \right]$$

となり界面電荷密度は小さく φ も小さいため

$$\frac{ve|\varphi(y)|}{k_B T} \ll 1$$

よって

$$\frac{d^2\varphi}{dy^2} = k^2\varphi$$

となり

$$k = \sqrt{\frac{2nv^2e^2}{\varepsilon_r\varepsilon_0k_B T}}$$

となる．これは電気二重層厚さの逆数である．

また境界条件

$$\left(\frac{d\varphi}{dy}\right)_{y=+0} = -\frac{\sigma_0}{\varepsilon_r\varepsilon_0}$$

を代入すると拡散電気二重層内の電位分布は

$$\varphi(y) = \varphi_0 \exp(-ky)$$

で表すことができる．

直流を印加したときに流体に作用する現象としてよく知られているのが電気浸透流である．この流体の速度は以下の式で示すことができる．

$$v = \frac{\varepsilon E_t \zeta}{\eta}$$

ε は溶媒の誘電率, η は粘度, ζ はゼータ電位を表している．ゼータ電位は界面電荷密度量 σ_q に比例しているため, 次の式で表すことが可能である．

$$v = \frac{E_t \sigma_q}{k\eta}$$

・ AC Electroosmosis 平行平板電極⁽²¹⁾

不均一電場では，電場の構成要素は，Fig.2.2.1 のように電極表面に対して接線方向 E_t に存在する．また中間の周波数で交流電気浸透流の速度が速くなっており高周波数および低周波数で遅くなっていることが知られている．交流電場では電気二重層の分極は周波数に依存している E_t や $\Delta\sigma_q$ の強度の効果によるものである．高周波数での電位は溶媒中で電圧降下する．一方周波数 1Hz などの低周波数では電極が完全に分極される．これらの結果からある条件より低い周波数や高い周波数では交流電気浸透流は誘起されないことが知られている．電気二重層によるキャパシタンス $\Delta C = \epsilon k d \Delta z$ で示される．また抵抗値は $R(z) = \pi z / \sigma d \Delta z$ で示される．これより時定数 τ はキャパシタンスと抵抗の半分をかけたものである．そのため電場強度 V_d は次の式で示される．

$$V_d = \frac{V_0/2}{1+j\omega\tau/2} = \frac{V_0}{2+j\omega\pi r \frac{\epsilon}{\sigma} k}$$

V_0 は交流電場の強度である．また

$$\Delta\sigma_q(z) = \epsilon k V_d, \quad E_t = -\frac{\partial V_d}{\partial z}$$

となるため，平面平板のときの交流電気浸透流の速度は

$$U_{ACEO} = \frac{1}{2} Re \left\{ \frac{E_t \Delta\sigma_q}{k\eta} \right\} = \frac{1}{8} \frac{\epsilon_m V_0^2 \Omega^2}{\eta r (1 + \Omega^2)^2} \quad (2.2.1)$$

$$\Omega = \omega r \frac{\epsilon_m}{\sigma_m} \frac{\pi}{2} k$$

と示すことができる．

2.3 エレクトロポレーション(Electroporation: EP)

エレクトロポレーションは、電圧パルスによって脂質および脂質 - タンパク質膜を多孔質かつ透過性に、一時的および可逆的にする電気技術である。

バイオテクノロジー分野や医学分野において一般的に使用されるようにもにもかかわらず、電圧パルス印可に伴う分子スケールの細胞膜穿孔メカニズムや分子送達の要因は未だ完全には解明されていない技術である。しかし、近年の物理化学的分析の進歩に伴い、脂質二重膜モデルにおいて数々の信頼性の高い膜穿孔理論が確立し始めている⁽²⁶⁾。以下にその一例であるエレクトロポレーションにおける膜穿孔の理論を記述する。

生細胞は脂質と脂肪酸からなるエステル分子から構成される脂質二重膜で覆われている。脂質二重層のモデルを Fig.2.3.1⁽²⁷⁾に示す。疎水性の脂肪酸が並列しており親水性の脂質が表面に向いている。膜表面は外環境になじみ、内側に並んだ疎水基により外界と細胞内を分離しているが、イオンなどの水溶性物質を透過可能としている。

細胞が一定以上の電場強度下に置かれることで、細胞の細胞膜上に生じる膜電位 $\Delta\phi_m$ は、電場印可直後電極により生じる電圧のほんの一部であるが、時間が経つにつれ徐々に蓄積して定常値となる。この定常値となった膜電位 $\Delta\phi_m$ が一定の膜電位を超した場合、通常時は整然と整列している脂質二重層の脂質部に分極が生じ、変形・細胞膜内外の癒着を引き起こし、物質が通過できる孔が形成され则认为られている。しかしこの孔はあまりにも小さな孔径である為、今現在も観測を可能としていない。電場印可を取り除くことにより、膜電位 $\Delta\phi_m$ はゼロになり、脂質部の分極が解消され最初の脂質二重層の配置に戻り、孔が塞がれることとなる。この孔閉塞は電場印可を除去してから通常 2~3 分後に完了し、さらに数時間後に弾力性のある細胞膜へと戻る。

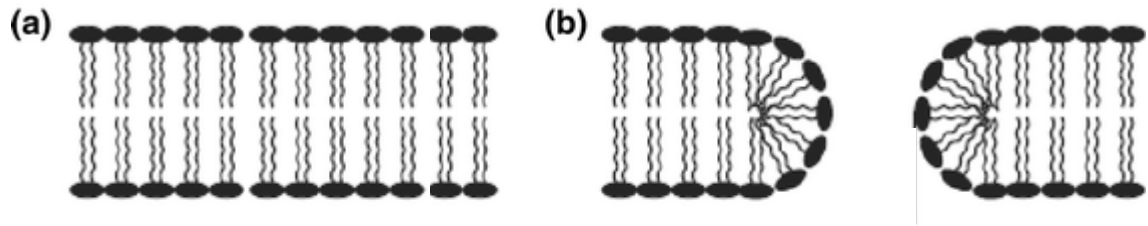


Figure2.3.1 The structure of (a) hydrophobic and (b) hydrophilic pores created in cell membrane

理論上，半径 a を有する単一球状細胞が電場強度 E の均一な電場にさらされた場合，その膜電場強度 E_m は以下のように示される．

$$E_m = -\Delta\phi_m/d \dots (2.3.1)$$

ここで $\Delta\phi_m$ は交差膜電位差であり， $d \doteq 5\text{nm}$ は誘電体膜の厚さである．

$$\Delta\phi_m = -faE\sigma_c |\cos \theta| \dots (2.3.2)$$

ここで f は無次元係数， θ は細胞の中心から電場方向に対して測定された角度，である． 無次元数 f は，生理的条件下では $f \approx 1.5$ で表すことができる．

よって膜電位 $\Delta\phi_m$ は

$$\Delta\phi_m = -1.5rE\sigma_c |\cos \theta| \dots (2.3.2)$$

このように半径 r に比例し， 向かい合う平板電極に対して並行の細胞の極で最大値に達し， 平板電極に対して垂直な細胞極点で 0 に等しくなる．
その際の膜電位 $\Delta\phi_m$ の分布モデルを Fig2.3.2⁽²⁶⁾に示す．

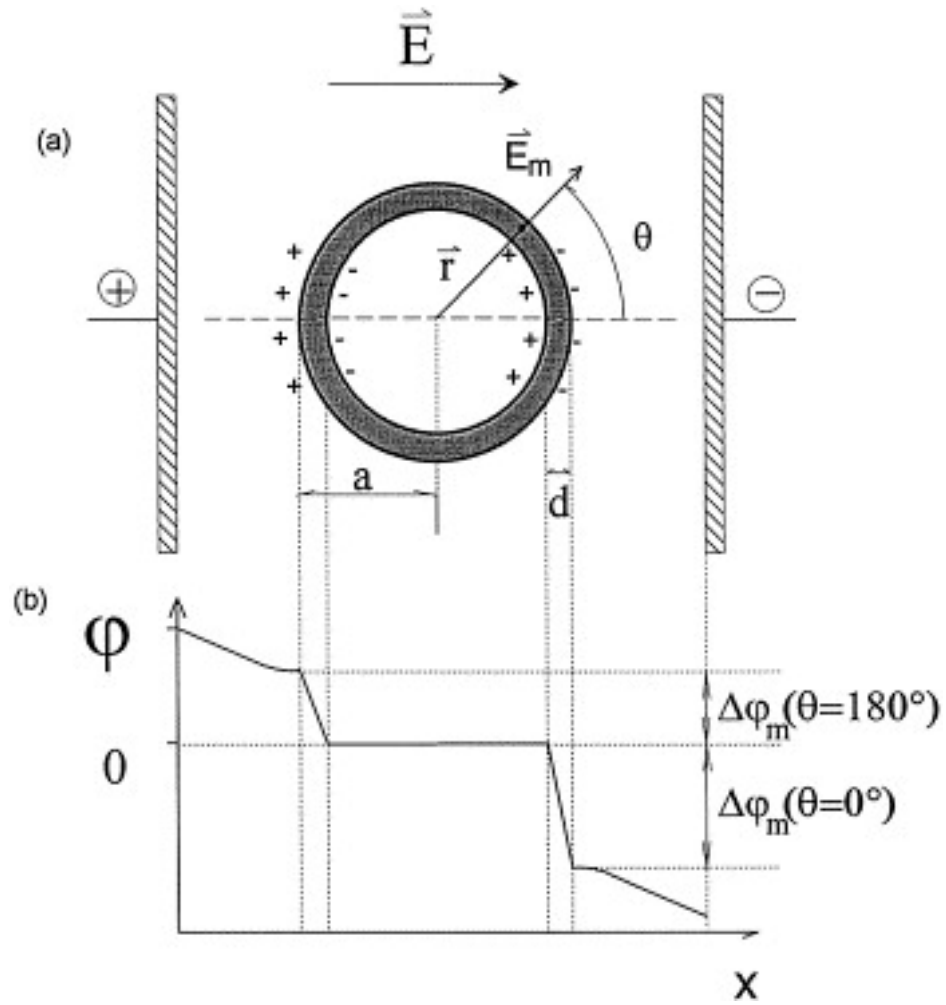


Figure.2.3.2 The profile of the electrical potential ϕ across the cell membrane of thickness d in E as a function of distance x

三章 実験装置及び実験方法

3.1 実験装置概要

本実験では Fig.3.1.1 に示す実験装置を用いて計測を行った。

実験装置に含まれている主な構成要素は細胞操作部・電場印加電源部画像撮影部の三点である。

以降はこの三点の実験装置についての詳細を記述する。

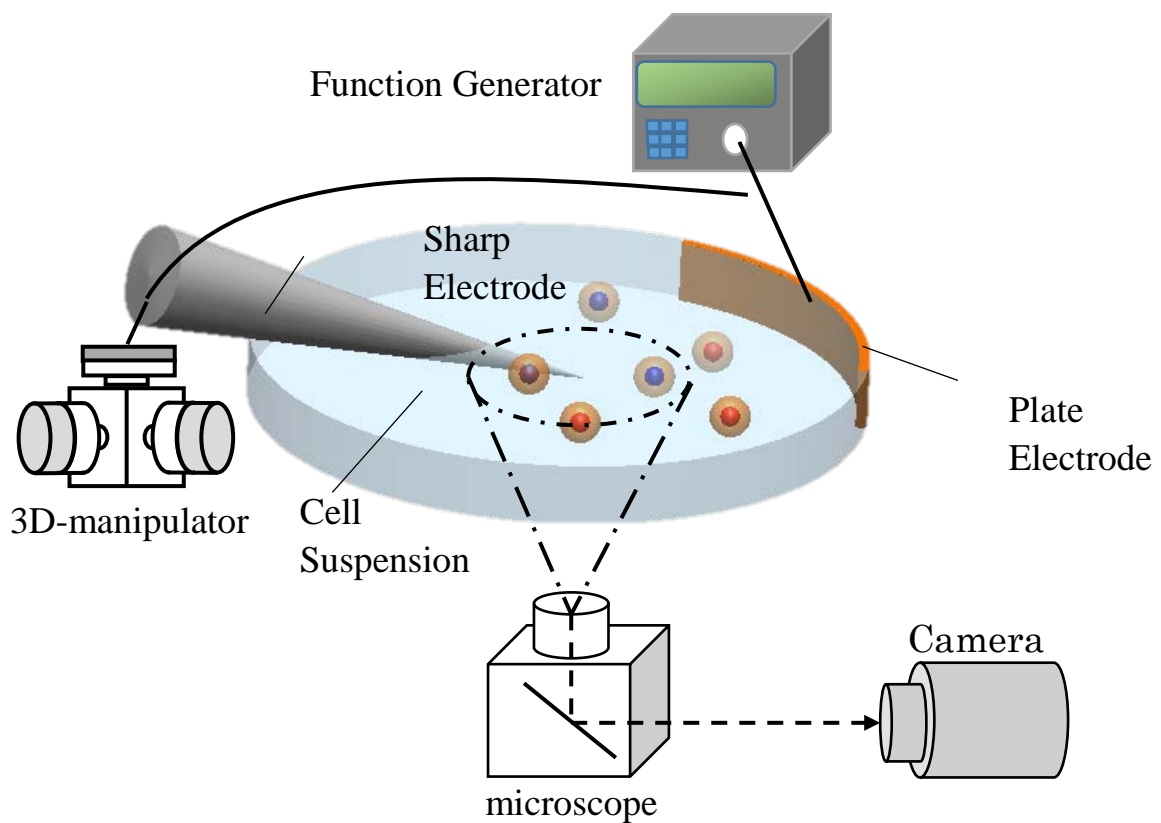


Fig.3.1.1 Experiment apparatus

3.1.1 細胞操作部

細胞操作部とは、細胞操作を行う際に用いる電極とガラスベースディッシュからなる部のことである。電極には先鋭電極ならびに対向する平板電極からなる一対の電極を使用した。先鋭電極は先端径 $1\mu\text{m}$ のタングステン針(M904-0006, 駿河精機製), 平板電極は銅製テープを用いた。先鋭電極は三次元油圧マニピュレータ(MMO-202ND, Narishige)により任意の位置に移動可能であり, 銅製平板電極は電極面が垂直になるようガラスディッシュ(3911-035, IWAKI)に接着されている。この細胞操作部に粒子・細胞懸濁液を滴下し電場を印加し計測を行った。ガラスディッシュの仕様を Table3.1.1, 3次元油圧微動マニピュレータの仕様を Table3.1.2, タングステン製の先鋭電極の仕様を Table3.1.3 に示す。

2次元電界解析ソフトである SATE(ASL 社)を用いて解析した本細胞操作時の電場解析空間を Fig3.2.3 に示す。先鋭電極により誘起される電場強度 E は不均一となっており, 電極先端部に集中している。細胞操作実験時, Fig3.2.3 における電極先端部を中心とした $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の範囲の平均値を電場強度 E とみなし使用した。

なお, 本報告では電極先端近傍部に着目し, 先鋭化電極先端部中心を Fig.3.2.3 に示すように先鋭化電極先端部中心を座標系の原点とし, 対向電極に向かう先鋭電極軸方向を X 軸, 対向電極に平行方向を Y 軸とした座標系を電極座標系と呼び, 以降の実験および考察に使用した。

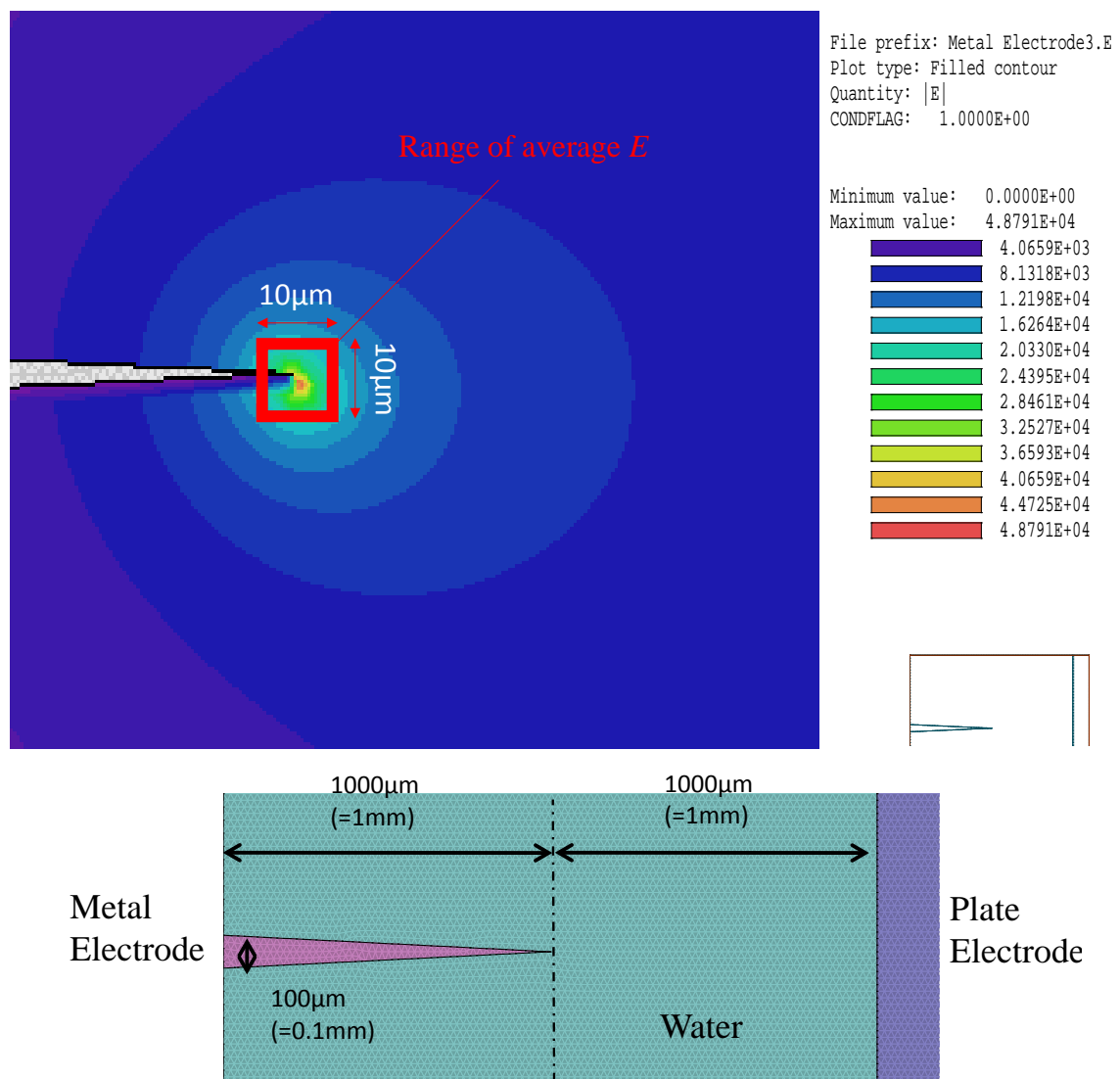


Fig.3.1.2 Electric field analysis distribution of sharp tip electrode

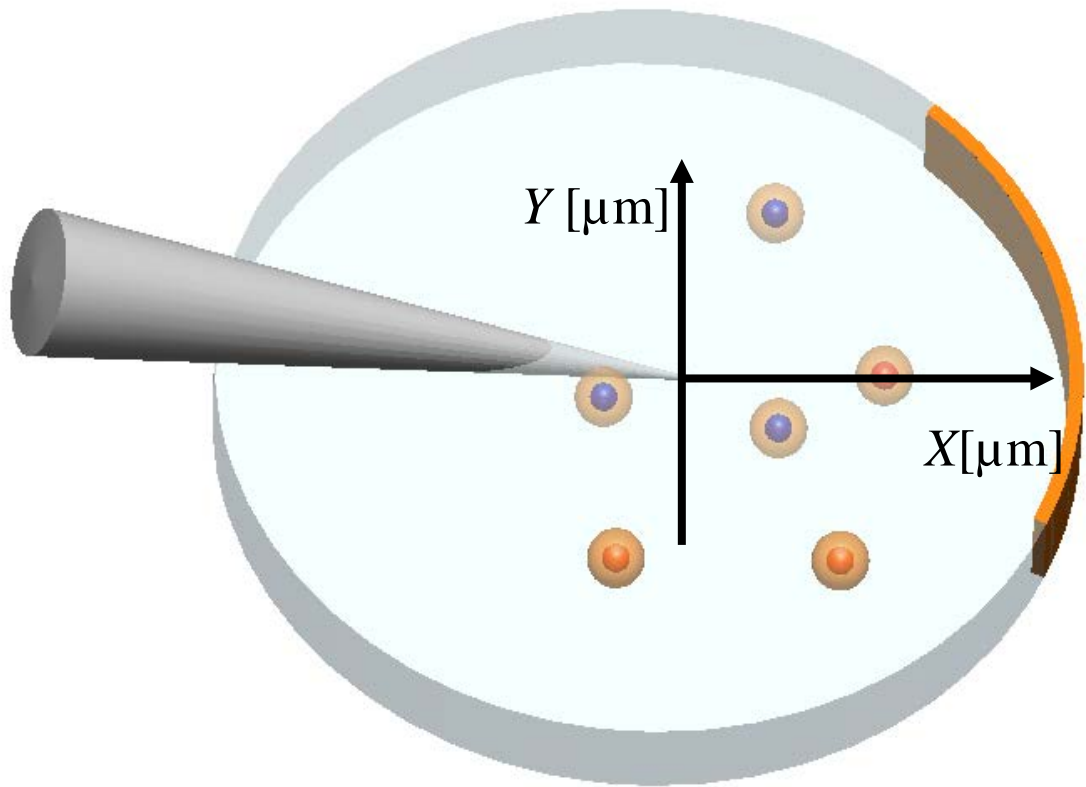


Fig.3.1.3 Coordinate system of cell manipulation (top view)

Table3.1.1 Glass dish specification

IWAKI ガラスベースディッシュ	3911-035
底面ガラス部直径 (mm)	12
カバーガラス厚 (mm)	0.12~0.17

Table3.1.2 3D-manipulator specification

製造会社	NARISHIGE
駆動距離	X, Y, Z 各 10mm ハンドル 1 回転 250 μ m 最小目盛 2 μ m
駆動距離	ジョイスティック (X-Y 平面上最大駆動距離) 2mm

Table3.1.3 Metal electrode specification

製造会社	駿河精機
先端径	1 μ m
外形×長さ	0.6×42mm

3.1.2 電場印可電源部

電場印可電源部とは、細胞操作部に交流電場および矩形波電場を印可する際に用いたファンクションジェネレータのことである。ファンクションジェネレータは周波数の高い交流電圧と任意の矩形波電圧を印加可能な信号発生器である。

本実験では、ファンクションジェネレータ WF1946B の 2 チャンネルより実験条件に対応した電圧・周波数の波形を生成し細胞操作に使用した。Table3.3.2 にその仕様を示す

Table3.1.4 Function generator specification

製造会社	エヌエフ回路設計ブロック
周波数	10mHz～15MHz
チャンネル数	2
周波数確度	±50ppm
出力インピーダンス	50Ω 固定

3.4 観察及び撮影部

電場印加による粒子ならびに細胞の動作を撮影した。撮影部は、倒立光学顕微鏡, CMOS カメラ, 光源から構成されており, カメラで取得された画像を PC に取り込み解析処理し画像計測をおこなった。細胞の操作様子や蛍光様子を観察する際に, 倒立型リサーチ顕微鏡 IX83 (OLYMPUS 社)を用いた。その仕様を Table3.1.5 に示す。80 倍, 100 倍の観察を行う際にはイマージョンオイルを対物レンズに滴下して油浸をする必要がある。細胞操作時の動作撮影の際には, 顕微鏡のサイドポート部にデジタル一眼カメラ ILCE-QX1(SONY 社)を接続し, 適宜静止画または動画を撮影した。デジタル一眼カメラ ILCE-QX1 の仕様を Table3.1.6 に示す。

Table3.1.5 Function generator specification

製造会社	OLYMPUS
対物レンズ倍率	× 10, × 20, × 40, × 60, × 100
コンデンサー	NA 0.55/ W.D. 26.2mm
内蔵フィルタブロック	B 励起, G 励起, U 励起

Table3.1.6 digital camera specification

製造会社	SONY
総画素数	2040 万画素
アスペクト比	3:2
最大連続撮影速度 [fps]	100

3.2 試料（粒子懸濁液，細胞懸濁液）

細胞は，マウス卵巢細胞 CHO-k1 を国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより分譲させていただいた培養して実験に用いた．CHO-k1 の仕様を Table.3.2.1 に示し，以降に細胞培養方法及び実験に使用する細胞懸濁液の作成方法を記す．なお本研究における細胞懸濁液中の生細胞率は90%前後であった。

Table 3.2.7 CHO-k1 specification

分譲元	JCRB 細胞バンク
細胞番号(JCRB)	JCRB9018
生物種	チャイニーズハムスター
組織名	卵巢
増殖速度 [hour]	12～24
培養時形態	接着性

【細胞培養方法⁽²⁸⁾及び細胞懸濁液作成方法】

- 1 実験予定日の数日前, 凍結細胞の入ったバイアルを 37° の温水中に浸し, 1~2 分間揺らしながら融解する.
- 2 用意しておいた 5mL 培地の入っているファルコンチューブ内に, バイアル中の細胞浮遊液 1mL を入れ, 軽くピペッティングした後, 1,000rpm で 5 分間遠心分離を行う.
- 3 遠心分離後, 上澄みを捨て培地で再懸濁しながら 5mL になるよう加えた後, およそ 1×10^6 cells/dish になるように 100 mm ディッシュに播種する. Fig3.2.1 に播種された直後の細胞観察様子を示す.
- 4 室温 37°C, CO₂濃度 5%に設定したクリーンベンチ内に容器を移し, 培養開始を開始し, 二日おきに培地交換を行う.
- 5 実験予定日, 細胞が接着しコンフルエントになったことを確認し, 上澄みを除去した後, 5 ml の PBS でディッシュを洗浄する. 培養細胞のコンフルエントの観察様子を Fig.3.2.2 に示す.
- 6 PBS をパスツールで採取し, 1 ml の Trypsin-EDTA を入れ, 37 °C で 3 min インキュベートする.
- 7 インキュベート後, 培地を 4 ml 入れ, 5 ml ファルコンチューブに採取した. 1000 rpm で 3 min 遠心分離を行う.
- 8 遠心分離後に上澄みを除去し, 細胞濃度 $1.0 \sim 10.0 \times 10^4$ cells/ml かつ導電率 6~7mS/m になるよう細胞操作用バッファーで希釈し細胞懸濁液を作成する.
- 9 細胞懸濁液に Propidium iodide を 5 μ l/ml の割合, calcein-AM を 1 μ l/ml の割合で加える.

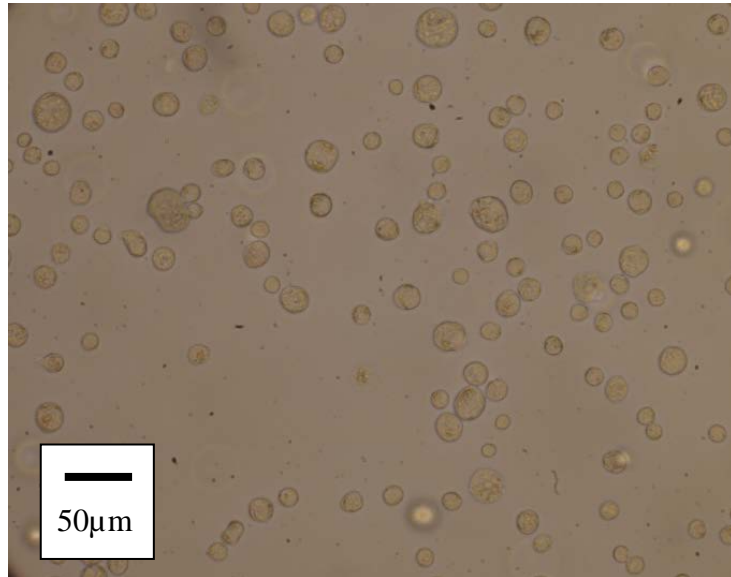


Figure 3.2.2 Cells after sowing dish

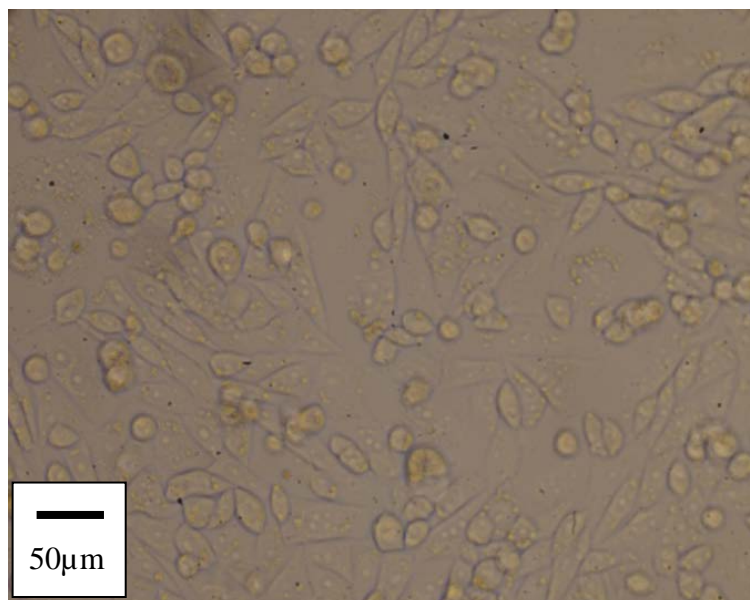


Figure 3.2.3 Confluence of sticking cells

CHO-k1 細胞の培養に用いた培地の組成を Table3.2.2, 培養時に用いた溶液を Table3.2.3, 培養に用いた器具の詳細を Table3.2.4 に示す. 本実験で使用しているバッファーは Table3.2.5 に示す組成から成り, 多くの細胞操作研究に用いられる代表的な低導電率バッファーである⁽²⁹⁾. 細胞懸濁液には生細胞染色液 Calcein-AM と核酸染色液 Propidium iodide (通称 PI)が加えられている. Calcein-AM は細胞膜透過性で、細胞内のエステラーゼによる加水分解で Calcein となり強い黄緑色の蛍光を示し, 主に細胞膜の保たれた生細胞識別に使用される. 実験に用いた Calcein-AM の詳細を Table3.2.6 に示す. 一方で, Propidium iodide(PI)は細胞膜不透過性で, DNA の二重らせん構造に入り込むことにより強い赤色の蛍光を示し, 細胞膜が損傷した死細胞識別に用いられる. 実験に用いた PI の詳細を Table3.2.7 に示す.

また, 流動観測実験に用いる粒子懸濁液は粒径が $0.5\mu\text{m}$ である蛍光ポリスチレン粒子をバッファーに粒子濃度 5.0×10^8 [個/gram]なるよう分散させたものを用いた. 蛍光ポリスチレンの詳細を Table3.2.8 に示す

Table3.2.8 culture medium specification

名称	製造元	用途	組成割合
Ham's F12 medium	和光純薬工業	基礎培地	89%
Fetal bovine serum(FBS)	和光純薬工業	血清	10%
Penicillin-Streptomycin Solution	和光純薬工業	抗生物質	1%

Table3.2.9 culture solution specification

名称	製造元	用途
Trypsin EDTA	和光純薬工業	接着剥離
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies	培地洗浄

Table3.2.10 culture equipment specification

名称	製造元	詳細
培養ディッシュ	IWAKI	ディッシュ径60mm
ファルコンチューブ	Argon technologies	5ml 容量,
遠心分離機	Thermo Scientific	最大遠心力 21,000×g

Table3.2.5 buffer specification

名称	製造元	用途	組成割合
Pure water	和光純薬	基礎溶媒	92.00%
Sucrose	和光純薬	浸透圧調整	7.85%
Dimethyl Sulfoxide	和光純薬	緩衝効果	0.15%

Table3.2.6 calcein AM specification

製造元	同仁化学研究所
名称	3',6'-Di(O-acetyl)-4',5'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein
化学式	$C_{46}H_{46}N_2O_{23}$
分子量	994.86
励起波長 λ_{ex} [nm]	490
蛍光波長 λ_{em} [nm]	515

Table3.2.7 propidium iodide (PI)specification

製造元	Life Technologies
名称	3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethyllummonio)propyl] -6-phenylphenanthridinium diiodide
化学式	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄
分子量	668.39
励起波長 λ_{ex} [nm]	530
蛍光波長 λ_{em} [nm]	620

Table3.2.8 Particle specification

製造元	Duke Scientific Corporation
名称	RED Fluorescent Polymer Microspheres
直径 [μm]	0.5
誘電率 ϵ_p [F/m]	2.26×10^{-11}
導電率 σ_p [mS/m]	0.37

3.3 実験方法及び実験条件

本論文では以下の実験と考察を行った.

- (a) 交流電場下における細胞への影響
- (b) 細胞操作分離評価
- (c) 交流電気浸透流評価
- (d) 局所エレクトロポレーション

以降は各実験方法及び実験条件の詳細を記述する.

3.3.1 交流電場下における細胞への影響検証実験

導電性の溶液内における交流電場印可により, 不可逆な細胞膜の電気化学反応, あるいは電氣的に活性な物質が電気分解を受けることによって, 細胞膜破壊がなされ細胞死に至る事が知られている⁽³⁰⁾. しかし, 細胞膜破壊といった細胞への影響を定量的に示す理論式は未だ明らかにされておらず, 安全に使用可能な電場条件を完全に把握することは困難である. そこで, 本研究における一連の細胞操作を行う為の電場条件が細胞に対して安全であることを実験により示す必要がある. 本実験では, 本細胞操作で利用する電気現象の誘電泳動, 交流電気浸透流を誘起する交流電場条件における細胞の形状をすることで, 細胞への影響を確認した. その結果を基に, 安全に使用可能な交流電場条件を明らかにし, 以降の細胞操作に活用する重要な基礎実験である. 本実験にて使用した誘電泳動と交流電気浸透流を誘起可能とする電場条件は, 本研究の先行研究となる大谷らが詳細にした条件を参考とした.

本実験では電場印可による細胞径変化に着目した. Fig3.3.1 に示すように, 電場印可前の細胞径 d_o に対し, 電場印可中の細胞径 d_t の細胞径比を ζ とする. 本評価における細胞径比 ζ は式(1)で定義される.

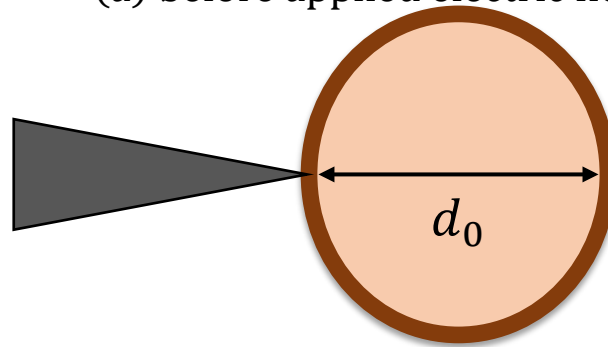
$$\xi [-] = \frac{d_t}{d_0} \dots (1)$$

事前実験により，電場印可中に細胞径が増加した場合，細胞の生存率 η_c が 0% であったことから，本評価では細胞径比 ξ が 1.0 を超えた場合を細胞致死とみなした．実験は 3D マニピレータにより先鋭電極先端部を細胞と接触する位置につけ，一度の電場印可につき一つの細胞を観測対象とした．この観測を複数回繰り返し，細胞印可により細胞致死した細胞数 N_D と生存した細胞数 N_L に分類し，生存率 η_c を算出した．本評価における生存率 η_c は式(2)で定義される．

$$\eta_c [\%] = \frac{N_L [-]}{N_L + N_D [-]} \times 100 \dots (2)$$

実験に使用した電場条件を Table.3.3.1 に示す．主に本細胞操作時に変化させる電場条件の印可周波数 f と印可電場強度 E に対する細胞の生存率に着目した．これらの印可周波数 f は先行研究の大谷氏により明らかにされた，本細胞操作に使用する誘電泳動と交流電気浸透流が顕著に生じる代表的な数値を使用している．大谷氏によると本研究と同様の低導電性溶媒において印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ 以上で印可周波数 $f=100\text{k}\sim 1\text{MHz}$ において交流電気浸透流，印可周波数 $f=500\text{k}\sim 5\text{MHz}$ において誘電泳動が顕著に生じることが報告されている．そこで本研究で用いる動物細胞に対する上記交流電場条件下の影響を 3 分間観測した．観測時間 3 分間は電気穿孔された孔が閉塞するまでの時間とされる為，本細胞操作における物質輸送段階時の交流電気浸透流を使用時間とした．

(a) before applied electric field



(b) during applied electric field

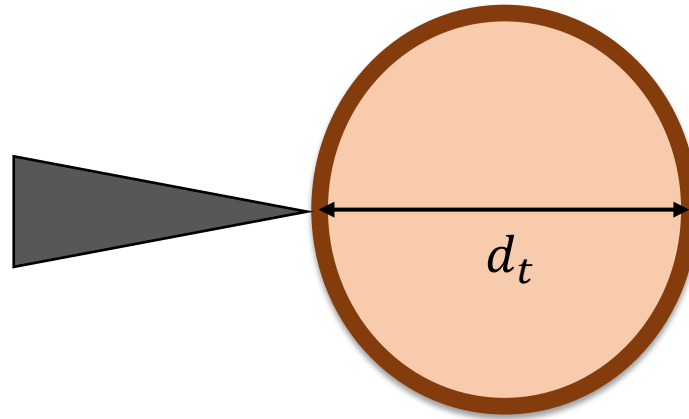


Figure 3.3.4 The model of cell deiameter change rate

Table 3.3.11 Experimental condition

Frequency f [Hz]	100k, 500k, 1M, 3M, 5M
Electric field intensity E [V/mm]	25, 50, 75, 100

3.3.2 細胞操作分離評価実験

本細胞操作における選択的細胞選別が有用であることを示す為、理論式における細胞選別の検討を行った。また、その細胞選別がどれほどの精度で行われているかを把握する為、捕捉した細胞の生存率を確認し生死細胞分離評価実験を行った。さらに、細胞選別の捕捉範囲を明らかにする為、先鋭電極から一定距離離れた生細胞の捕捉に成功する確率を調べる分離操作可能範囲把握実験を行った。

誘電泳動により先鋭電極先端部に捕捉した細胞の生死判別を行う為、印可電場前と印可電場後の蛍光観察と明視野観察様子を撮影し、蛍光を示す細胞と示さない細胞の挙動を各々観測した。電極先端部に捕捉された細胞のうち、赤色蛍光を示さない生細胞 N_L と赤色蛍光を示す死細胞 N_D の数をカウントし、生細胞捕捉率 S_{DEP} を算出した。本評価における生細胞捕捉率 S_{DEP} を式(3)に示す。

$$S_{DEP} [\%] = \frac{N_L [-]}{N_L + N_D [-]} \times 100 \dots (3)$$

分離操作可能範囲把握実験では、細胞先端部から一定の位置に離れた細胞が捕捉された確立 W_c を求めた。

実験に使用した電場条件は、前項の実験により求めた安全域電場条件の誘電泳動が顕著にでる電場条件を用いた。その電場条件を Table.3.3.2 に示す。分離操作可能範囲検証実験における先鋭電極先端部からの距離条件を Table.3.3.3 に示す。

Table 3.3.12 Experimental condition

Frequency f [Hz]	100k, 500k, 1M, 3M, 5M
Electric field intensity E [V/mm]	25, 50, 75, 100

Table 3.3.13 Distance from tip to a cell

Distance from tip d_{tip} [μm]	50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500
---	--

3.3.3 交流電気浸透流評価実験

本細胞操作における物質輸送時に使用する際に、電極周りの誘起される流動がどのような流動形成になっているのか明らかにされていることが重要である。先鋭電極極近傍の交流電気浸透流の流れ様相を把握する為、粒子懸濁液を使用し誘起流による粒子挙動把握実験を行った。さらに、交流電気浸透流により電極先端部に生じる流速を明らかにする解析を行った。

電場印可し交流電気浸透流が誘起されたことによる蛍光粒子の動きを顕微鏡に接続したデジタルカメラ(100fps)で撮影した。0.01 秒毎の画像を取り込み、画像処理ソフト ImageJ を用いた電極先端部極近傍に位置する蛍光ポリスチレン粒子に注目した手動粒子追跡 PTV を行った。

電場条件を Table.3.3.4 に示す。先行研究の大谷氏による報告では、印加電場周波数 $f=1\sim 100\text{kHz}$ における先鋭電極近傍に誘起される交流電気浸透流に着目し、マイクロレベル微小領域において流体及び物質の混合や輸送、細胞を並べるこ

とに効果的であると示してきた。一方で、 $f=1\text{MHz}$ 以上の印加周波数領域では、交流電気浸透流が優位に働いていないと結論付けた。その際の実験は、使用した蛍光ポリスチレン粒子径が $3\mu\text{m}$ で電極先端部から $10\mu\text{m}$ 離れた位置を倍率 40 倍で観察したデータの速度計測であった。しかし、本研究における $0.5\mu\text{m}$ の蛍光粒子を使用した倍率 100 倍の拡大観測方法により電極先端部極近傍を観測したところ、大谷氏の計測法における $f=1\text{MHz}$ 以上の印加周波数領域で観測できなかった交流電気浸透流が電極先端部極近傍に誘起されていることを発見した。そこで、本研究では粒子径が $0.5\mu\text{m}$ の蛍光ポリスチレン粒子を使用し、倍率 100 倍で観測することで観測された電極先端部極近傍の粒子挙動に着目し、流れの様相と誘起されている流速を明らかにした。

Table 3.3.14 Experimental condition

Frequency f [Hz]	100k, 500k, 1M, 3M, 5M
Electric field intensity E [V/mm]	25, 50

3.3.4 局所エレクトロポレーション実験

本細胞操作における物質導入時の膜穿孔を担う，先鋭電極により生じる局所電場を用いたエレクトロポレーションの評価及び検証を行う為に下記に示す実験を行った．以降は各実験に対する詳細を記す．

- I. 局所電場エレクトロポレーションを用いた物質導入実験.
- II. 局所電場エレクトロポレーションによる導入過程の蛍光観察実験
- III. 交流電気浸透流による物質輸送を活用した局所電場エレクトロポレーションを用いた物質導入実験

I. 局所電場エレクトロポレーションを用いた物質導入実験.

先鋭電極によって生じる局所電場を用いたエレクトロポレーションによる導入効率と生存率を明らかにする実験を行った．また，比較対象として従来手法の平板電極を用いた均一電場エレクトロポレーション実験も同様の電場条件かつ評価手法で行った．

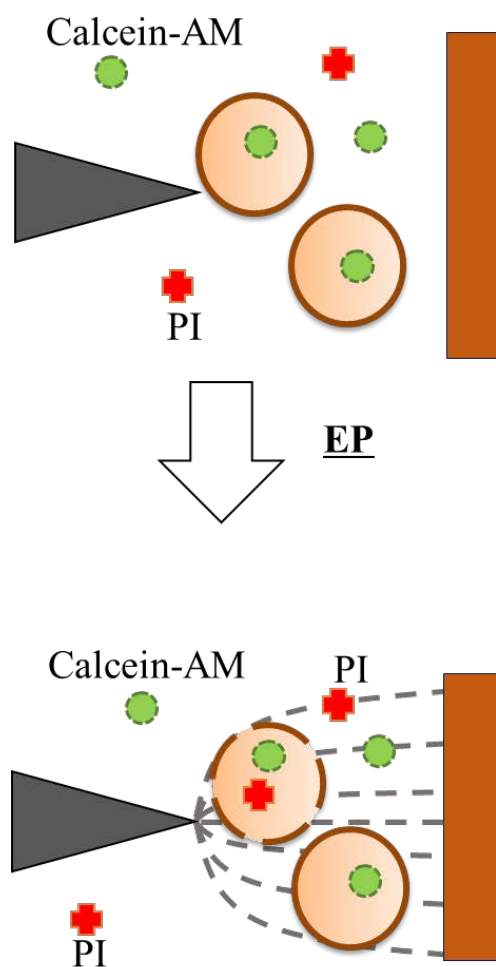
細胞膜不透過性の核染色蛍光試薬 **PI** は膜損傷のした細胞の識別によく用いられるが，本実験では膜穿孔が行われ細胞内に取り込まれたことを意味する蛍光物質として利用した．一方でエレクトロポレーションによって細胞が死んでいないかどうかの識別を行う為，事前に生細胞に取り込まれている **Calcein-AM** がパルス電場の印可 3 分後にも蛍光を示し続けていることで生存識別を行った．仮にエレクトロポレーションにより細胞が死んでしまった場合，細胞膜の破壊により細胞内物質が漏出してしまう為，**Calcein-AM** も漏出し蛍光を示さなくなる．本実験においては Fig.3.3.2 に示すように，**PI** により染色された細胞は赤色

蛍光 $\lambda_{em}=620\text{nm}$ を示し, calcein-AM の漏出のない生存した生細胞は緑色蛍光 $\lambda_{em}=515\text{ nm}$ を示すこととなり, 赤色蛍光と緑色蛍光の両方を示すものを導入成功細胞とみなした. 一度の導入につき一つの細胞の導入を確認し, 総試行細胞数 N_a に対し, 生存した総生細胞数 N_b の割合を生存率 S_c とし, 生存かつ導入がなされた総導入成功細胞数 N_s の割合を導入効率 η_c とした. その定義式を式(4)(5)に示す.

$$S_c [\%] = \frac{N_b[-]}{N_a[-]} \times 100 \dots (4)$$

$$\eta_c [\%] = \frac{N_s[-]}{N_a[-]} \times 100 \dots (5)$$

実験に使用した電場条件を Table.3.3.5 に示す. 使用した電場強度 E 及びパルス幅 Δt は, 数々の研究者が低導電性バッファー内のエレクトロポレーションにおいて成功事例を示してきた条件を参考に設定した⁽³¹⁾.



エレクトロポレーションによりPIが導入された細胞は赤色蛍光を示す.

細胞膜の損傷がない生存した細胞は緑色蛍光も示す.

Figure 3.3.5 Method of identifying injecting cell

Table 3.3.15 Experimental condition

Pulse length Δt [ms]	10, 50, 100
Electric field intensity E [V/mm]	60, 80, 100

II 導入過程の蛍光観察実験

エレクトロポレーションにより蛍光物質 **PI** が取り込まれていく蛍光様相を観察した．エレクトロポレーション後，最初に蛍光が観測された位置を明らかにすることで，細胞の臨界膜電位を越え膜穿孔が行われたとされる位置を特定した．導入過程の蛍光観察実験は先鋭電極による局所電場エレクトロポレーション及び平板電極による均一電場エレクトロポレーションの二通り行った．

エレクトロポレーションによるパルス電場の印可直後の **PI** が取り込まれていく蛍光様子の映像をデジタルカメラにより撮影し，**ImageJ** に取り込み画像解析を行った．**Fig3.3.4** に示した先鋭電極先端部と細胞接触部を原点とし，電極からの距離を細胞径で除し無次元化した座標系を細胞操作座標系 $[X_c, Y_c]$ と定義した．電場印可後 10,30,60,90,120,150,180 秒の細胞操作座標系における $Y_c = 0$ 断面の蛍光分布により，細胞内における **PI** の拡散様相を明らかにした．また，蛍光物質の孔内輸送が行われた直後と考えられるパルス電場印可 10 秒後，最大蛍光強度を示した位置を膜穿孔が行われた位置と定義し，その膜穿孔分布を明らかにした．

パルス電場印可 10 秒後の細胞膜部にあたる細胞円周部の蛍光を開孔部と仮定し，局所電場エレクトロポレーションと均一電場エレクトロポレーションにおける開口部に着目した．**Fig3.3.5** に示した先鋭電極と細胞の接触部を始点とし，細胞中心から開き角 θ 点 r_1 における蛍光強度を読み取り，細胞円周部の蛍光分布を明らかにした．その蛍光分布に対しモード法を基に **PI** 導入による蛍光閾値を決め，蛍光を示した部位を開孔部とみなし，細胞円周に対する開孔部中心角 θ_c の開孔部率 P_c を求めた．本評価における開孔部率 P_c を式(6)に示す．

$$P_c [-] = \frac{\theta_c}{2\pi} \dots (6)$$

実験に使用した電場条件を Table.3.3.6 に示す．前項で最も細胞に安全かつ高導入効率な物質導入に成功した電場条件を使用した．

Table 3.3.16 Experimental condition

Pulse length Δt [ms]	50
Electric field intensity E [V/mm]	80

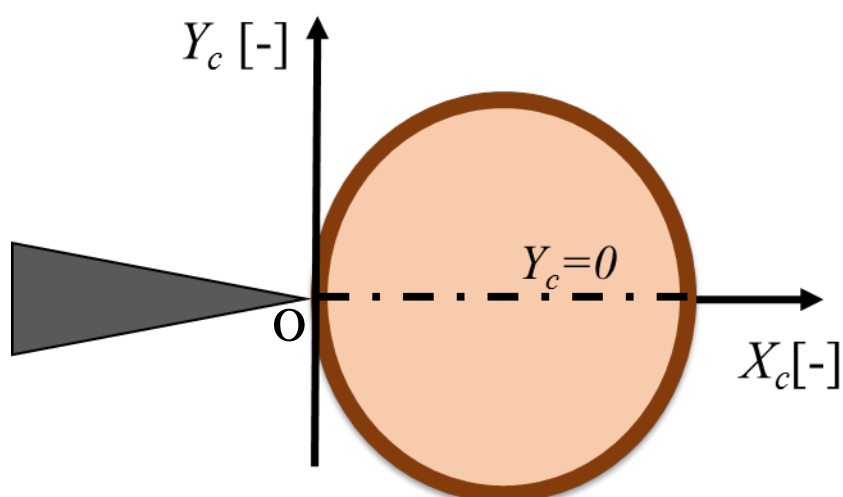


Figure 3.3.6 Coordinate system of evaluating fluorescence distribution in a cell

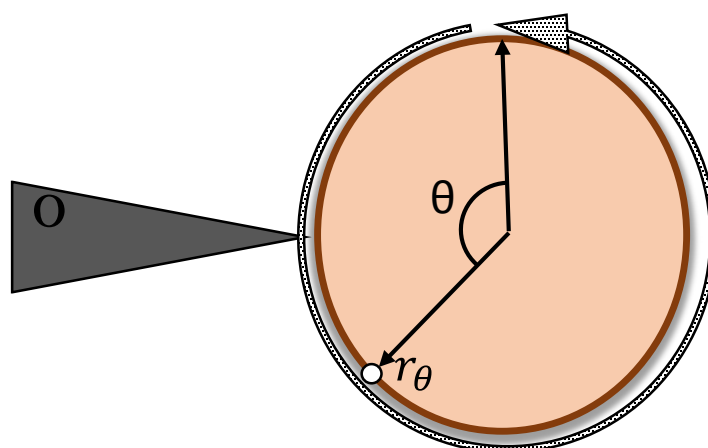


Figure 3.3.7 Point of evaluating fluorescence distribution at a cell membrane

III. 交流電気浸透流による物質輸送を活用した局所電場エレクトロ

ポレーションを用いた物質導入実験

本細胞操作における局所電場エレクトロポレーションによる膜穿孔と交流電気浸透流による導入物質輸送を統合利用した物質導入プロセスの評価を行った。任意のパルス電場を印可し局所電場エレクトロポレーションを行った直後、交流電気浸透流を誘起可能とする交流電場を3分間印可した。先に行った導入効率と生存率を明らかにする実験方法と同様の評価方法により、導入物質輸送を利用した際の導入効率と生存率を明らかにした。本実験に使用した電場条件をTable.3.3.7に示す。物質輸送に使用した交流電気浸透流の条件は最も細胞に安全かつ拡散現象以上の輸送が期待できる条件を使用した。

Table 3.3.17 Experimental condition

Electroporation

Pulse length Δt [ms]	60,80,100
Electric field intensity E [V/mm]	10,50,100

AC-electro-osmosis flow

Frequency f [Hz]	3M
Electric field intensity E [V/mm]	50

四章 実験結果および考察

4.1 交流電場下における細胞への影響

不均一交流電場を使用する細胞操作を行うための基本として、交流電場下における細胞への安全性を検証した。様々な印可電場条件における細胞の細胞径変化に着目し、EP 後の膜修復に要する 3 分間における細胞への影響を調べた。

4.1.1 印可電場による細胞膨張

細胞が過多の電気エネルギーにより細胞膜が破壊され、徐々に膨張した様子を Fig4.1.1 に示す。Fig4.1.1 における細胞径に着目すると、初期細胞径 d_0 に対してある時刻の細胞径 d_t は、 $t=9s$ において d_t が d_0 を上回り、更に細胞径は増加していき、やがて $t=11s$ のように細胞膜が明確に確認できない程に膨張していった。このように細胞径が突如として膨張していった細胞を蛍光顕微鏡により死細胞確認を行うと、必ず染色がなされていて死細胞であった。細胞径の変化した細胞は細胞死に至ることが明らかになった。以降の細胞に対する影響は細胞径が変化した場合を細胞死を起こす電場条件とし、細胞死を起こさない電場条件を安全電場条件と定義する。

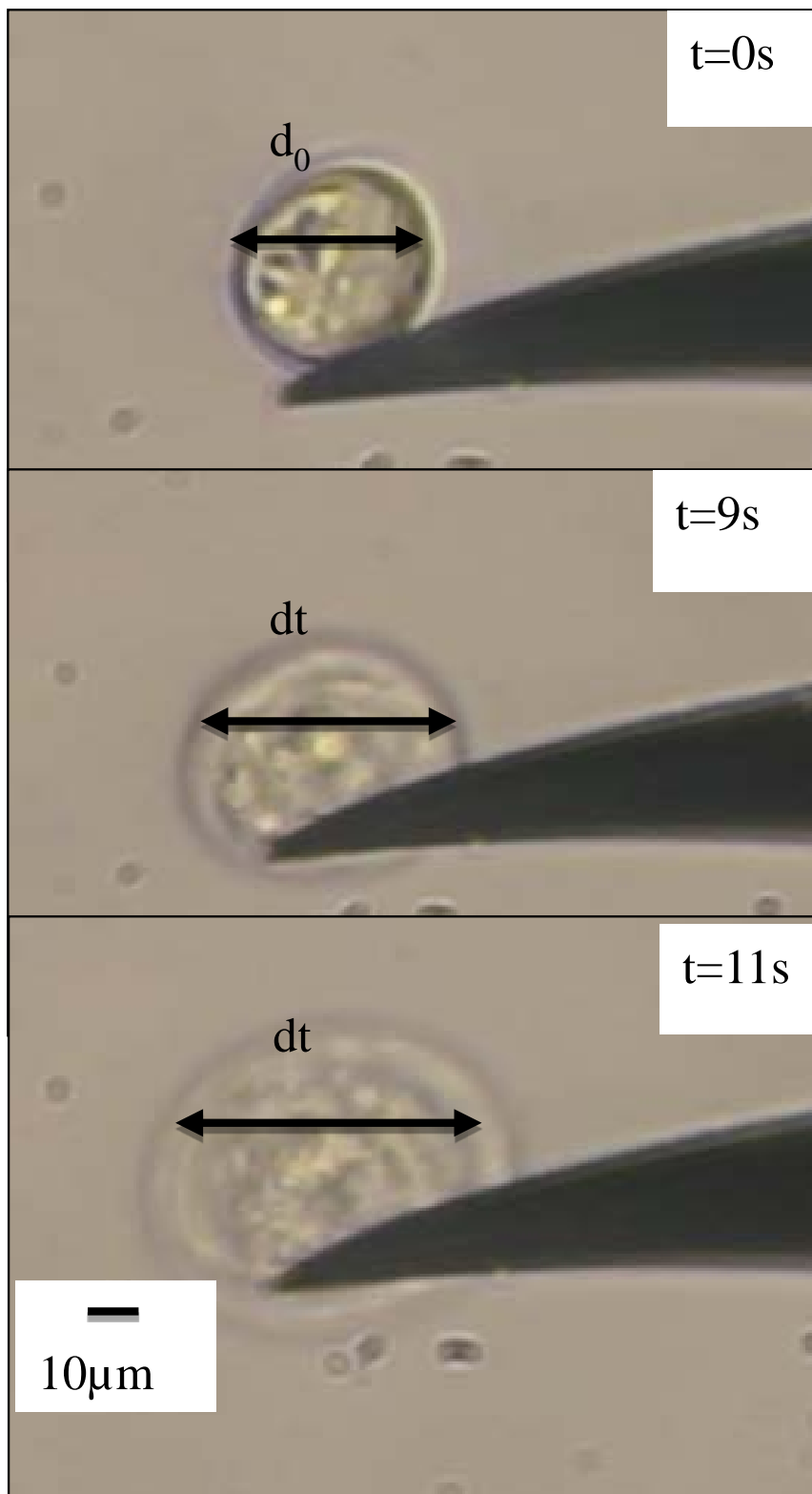


Figure 4.1.1 The state of cell swelling by applied AC electric field

4.1.2 印可電場強度及び印可周波数の影響

細胞が細胞死に至る印可電場条件を把握し、その条件を使用しない安全な細胞操作を行う必要がある。そこで、本細胞操作に使用しうる様々な電場における細胞への影響を詳細にする為、印可電場強度を $E=25\text{V/mm}$, 50V/mm , 75V/mm , 100V/mm , 印加周波数を $f=100\text{kHz}$, 500kHz , 1MHz , 3MHz , 5MHz と電場条件を変化させた際の細胞の影響を検討した。Fig4.1.2-6 に各印可周波数における 3 分の電場印可後の印可電場強度 E と生存率 Sc の関係を示す。全ての印可周波数 f 結果においても印可電場強度 E と生存率 Sc の関係は同様の傾向を示し、印可電場強度 E が高値であるほど生存率 Sc は低値を示している。特に印可電場強度が高値である $E=75\text{V/mm}$, 100V/mm では生存率 Sc は非常に低値を示し、細胞に許容以上の電気エネルギーが作用したと考えられる。本使用電場条件の印可電場強度においては $E=50\sim75\text{V/mm}$ に細胞致死の閾値が存在することが確認できた。更に各印可周波数 f に対する生存率 Sc の関係に着目すると、特に印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ における生存率 Sc に大きな差異が見られた為、印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ における印可周波数 f と生存率 Sc の関係を Fig4.1.7 に示す。 $f=500\text{kHz}$ と 1MHz における生存率 Sc を比較すると倍以上の差が見られた。Grosse and Schwan の報告によると、細胞間膜電位の計算モデルでは一定の印可周波数 f に達すると膜容量インピーダンスの低下により膜電位が急激に低下し細胞への負荷が考慮されなくなる⁽³²⁾。この膜容量インピーダンス低下現象が本実験における $f=500\text{kHz}$ と 1MHz 間で生じたことが考えられる。Grosse and Schwan が述べたように $f=1\text{MHz}$ 以上の高周波領域では細胞死が減少したことからも同様の現象が起きたことが考えられる。

実験により求めた全ての生存率 Sc を Table4.1.1 に示す。本結果より、生存

率 Sc が 70%以上となる電場条件を安全域とみなし，以降の細胞操作時に使用することとした．Tabele4.1.1 において灰色に分類した生存率 Sc が 70%以上となった $[E=25\text{V/mm}, f=100\text{k}\sim 5\text{MHz}]$, $[E=50\text{V/mm}, f=1\text{M}\sim 5\text{MHz}]$ を安全電場条件として使用する．

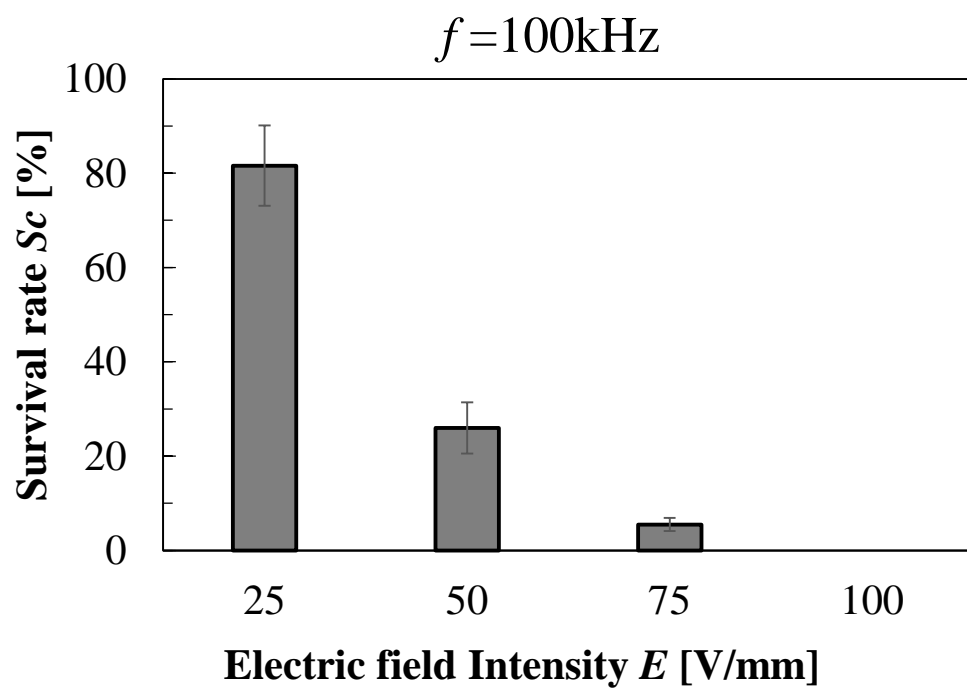


Figure 4.1.2 Relationship between survival rate and electric field intensity in $f=100\text{kHz}$

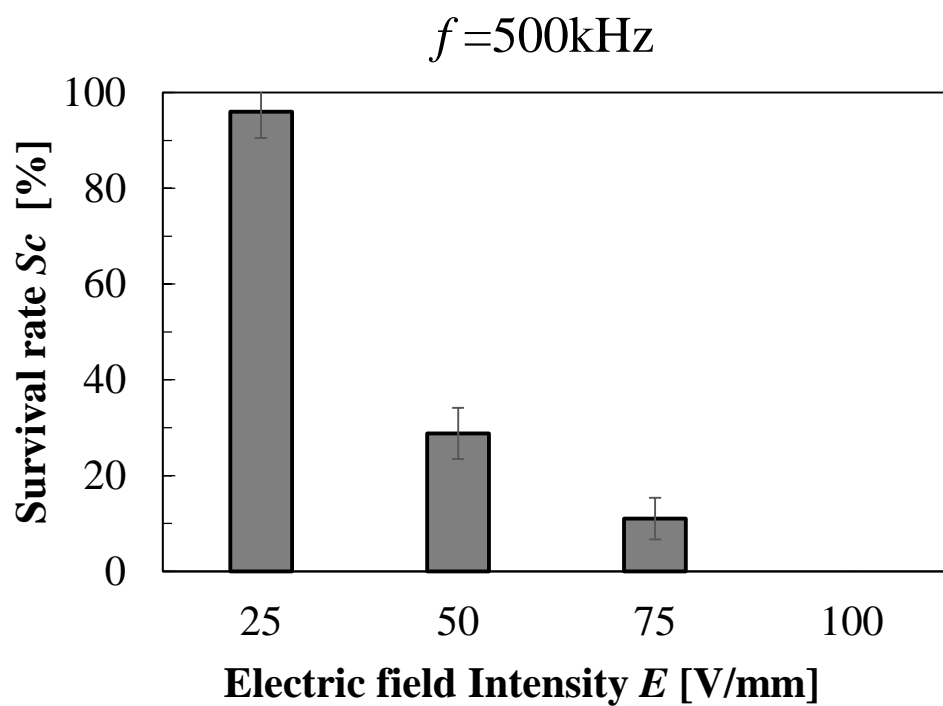


Figure 4.1.3 Relationship between survival rate and electric field intensity in $f=500\text{kHz}$

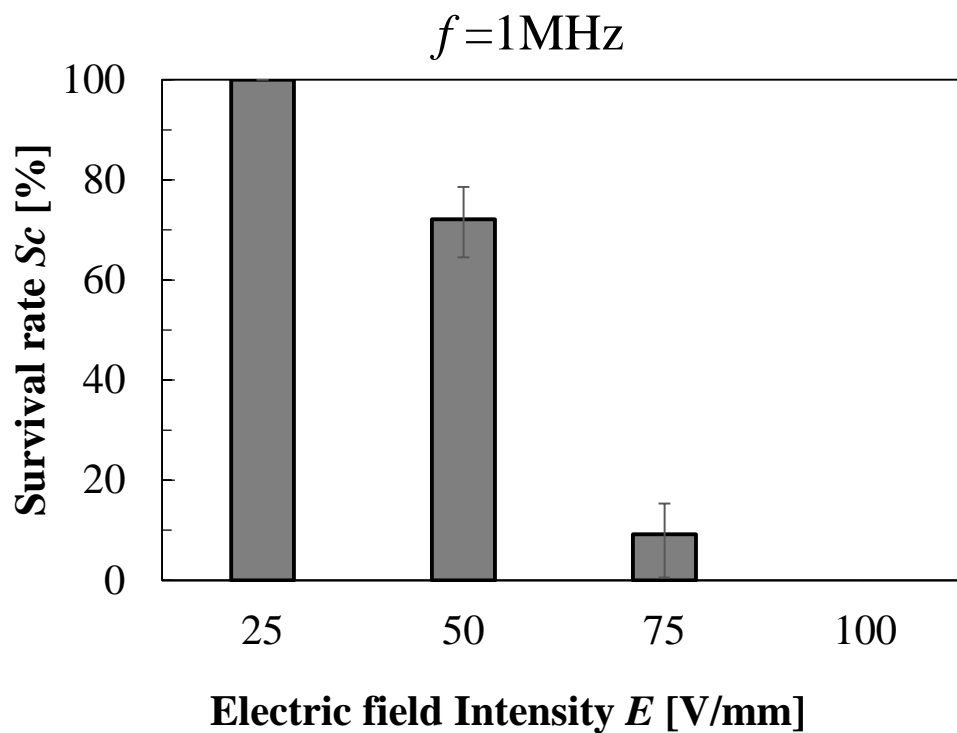


Figure 4.1.4 Relationship between survival rate and electric field intensity in $f=1\text{MHz}$

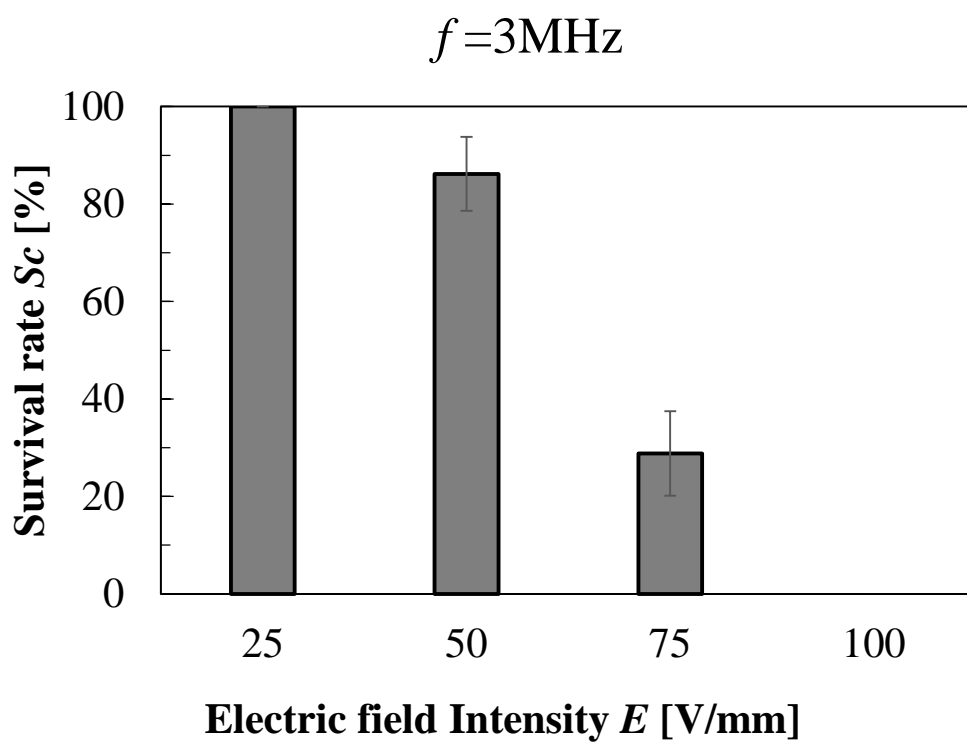


Figure 4.1.5 Relationship between survival rate and electric field intensity in $f=3\text{MHz}$

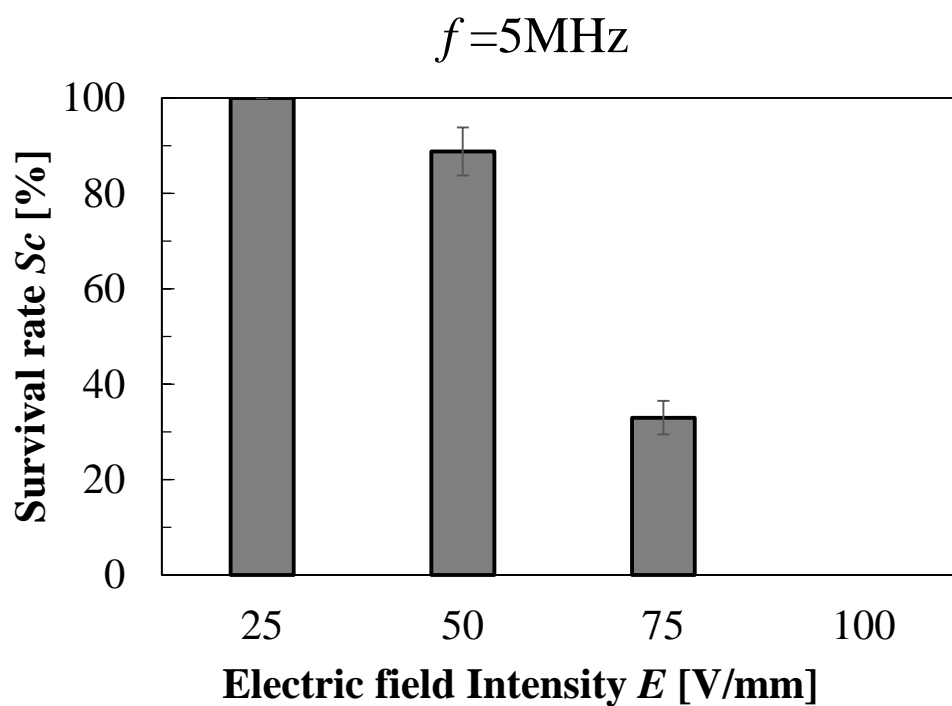


Figure 4.1.6 Relationship between survival rate and electric field intensity in $f=5\text{MHz}$

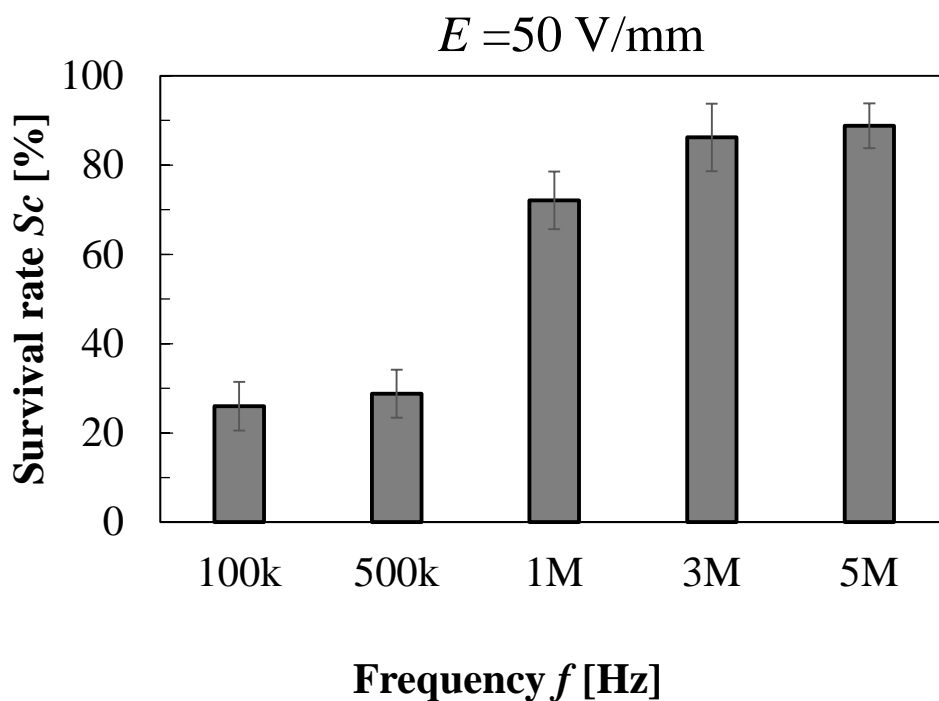


Figure 4.1.7 Relationship between survival rate and frequency in $E=50\text{V/mm}$

Table.4.1.1 Survival rate in several electric field condition

Hz V/mm	100k	500k	1M	3M	5M
25	81.6	96	100	100	100
50	26	28.8	72.1	86.2	88.8
75	5.5	11	9.2	28.8	33
100	0	0	0	0	0

4.2 細胞選別操作評価

本実験では本研究が提案する細胞操作技術における誘電泳動(Dielctrophoresis)を用いた選択的細胞選別の使用条件と有用性について検討した.

4.2.1 生死細胞選別印可周波数の算出

誘電泳動を使用するにあたって, 使用する最適な電場条件を把握することが必要である為, 誘電泳動の理論式(式 2.1 及び式 2.2)より死細胞と生細胞を選別可能となる条件の概算を行った. なお, 以降に使用する電場条件は前項 4.1 により明らかにした安全域電場条件を使用している.

Table 4.2.1 に理論式の概算に用いた物性値を示す. 正確な値が明らかとなっていない細胞の導電率及び誘電率は細胞解析を行っている文献を参考に用いた⁽³³⁾. 2.1 章で述べたようにクラウジウスモソッティ関係式 $\text{Re}(\mathbf{K})$ の実数値の符号と大きさが誘電泳動の力を決定する為, Figure4.2.1 にクラウジウスモソッティ関係式 $\text{Re}(\mathbf{K})$ と印可周波数 f の関係を示す. 生細胞の $\text{Re}(\mathbf{K})$ において, $f=1\text{k}\sim 5\text{MHz}$ 間では $\text{Re}(\mathbf{K})=1$ を示し, $f=5\text{M}\sim 10\text{MHz}$ 間で負の値へと変化している. 一方で死細胞の $\text{Re}(\mathbf{K})$ においては, $f=1\text{k}\sim 1\text{MHz}$ 間では $\text{Re}(\mathbf{K})=1$ を示し, $f=1\text{M}\sim 7\text{Hz}$ 間で負の値へと変化している. 生細胞と死細胞の $\text{Re}(\mathbf{K})$ を比較すると, $\text{Re}(\mathbf{K})$ が異なるのは $f=1\sim 5\text{MHz}$ 間であり, 適当な印可周波数を設定することで生細胞を捕捉可能であることが分かる. $f=1\sim 5\text{MHz}$ 間の印可周波数と $\text{Re}(\mathbf{K})$ の関係を正確に把握するために $f=1\sim 5\text{MHz}$ 間の拡大図を Fig.4.4.2 に示す. 死細胞における正負の遷移点は $f=3\text{MHz}$ 付近に存在し, この前後の印可周波数により振る舞いが異なる. $f=1\sim 3\text{MHz}$ 間の周波数領域では, 生細胞に対しては強い正の誘電泳動力が生じ, 死細胞に対しても微弱ではあるが正の誘電泳動力が生じている. よって, $f=1\sim 3\text{MHz}$ では完全に生細胞だけを捕捉することは難しいが, 死細胞に働く正の

誘電泳動力は生細胞に働くものに比べ微弱な力となるため、十分な精度で正細胞を選択的捕捉できると考えられる。一方で $f=3\sim 5\text{MHz}$ 間の周波数領域では、死細胞に負の誘電泳動力が生じるため、完全に生細胞のみを捕捉することが可能となる。

本細胞操作系においては、印可周波数 $f=1\sim 5\text{MHz}$ を使用することで、生細胞には電場強度が高い先鋭電極先端部へ引き寄せられる力が働き、最終的には電極先端部へ終着すると判断できる。一方で死細胞には電場強度の低い平板側へ引き寄せられる力が働くが、先鋭電極先端部から離れるほど電場勾配が小さくなり誘電泳動力は減少していく為、最終的には誘電泳動力が細胞を動かすだけの粘性力を上回れなくなり、平板電極までたどり着く前に動かなくなると判断できる。

以上の結果より、本細胞操作技術において使用する電場条件で生細胞と死細胞の細胞選別が理論上可能であることが示された。

Table.4.2.1 Values of the cells parameters for calculating $\text{Re} [K^*(\omega)]$

Living cells Permittivity ε_L	180 [-]
Dead cells Permittivity ε_D	10 [-]
Living cells conductivity σ_L	0.3 [mS/m]
Dead cells conductivity σ_D	0.0045 [mS/m]

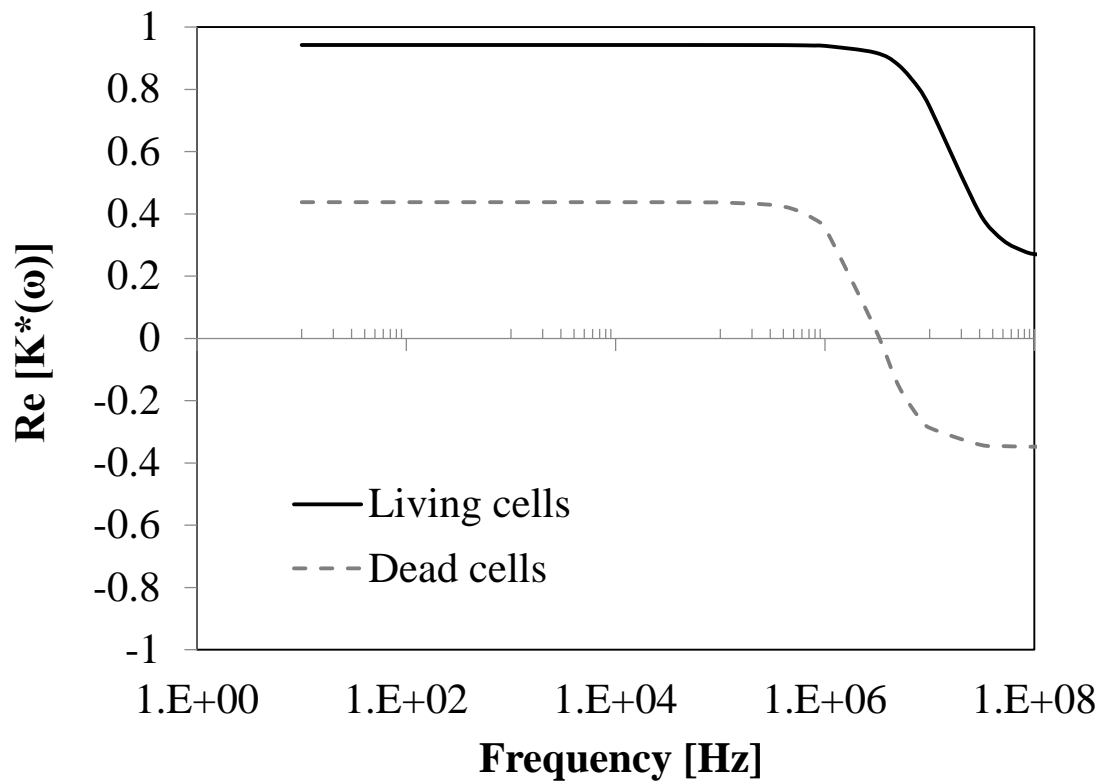


Figure 4.2.1 Clausius–Mossotti relation of living cells and dead cells

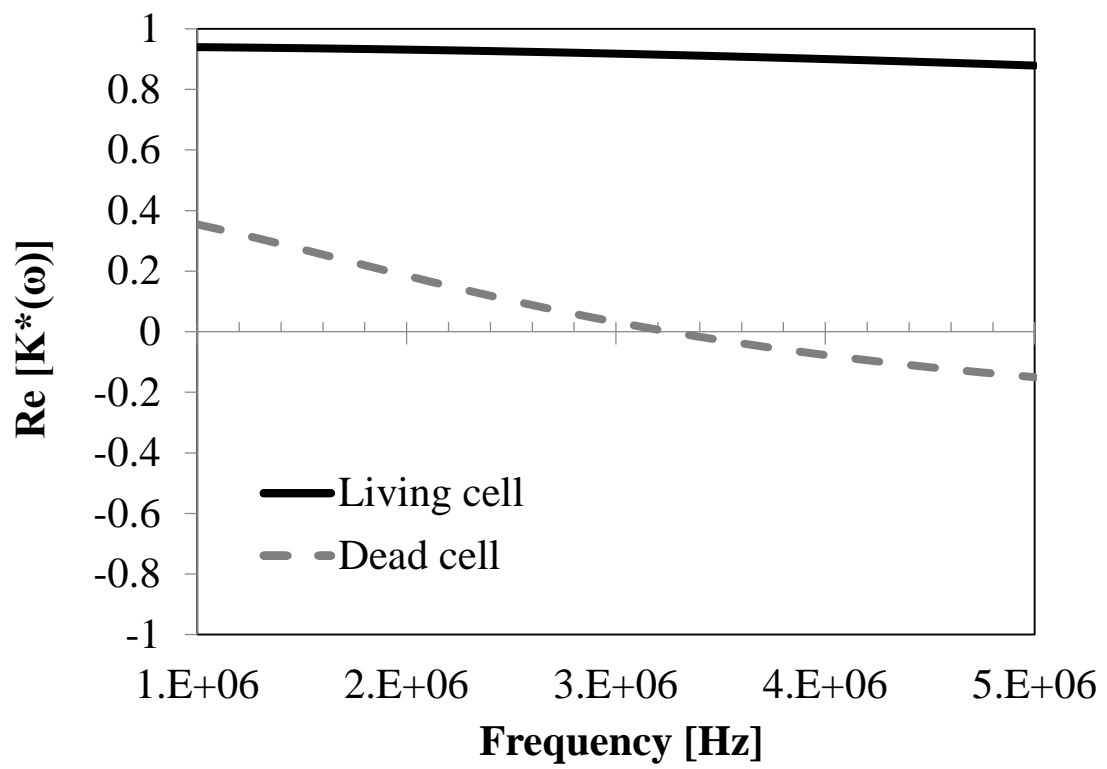


Figure 4.2.2 Clausius–Mossotti relation of $f = 1\sim 5$ MHz

4.2.2 生死細胞分離評価

生細胞と死細胞の電気特性の違いを用いて、生細胞を捕捉可能となる印可周波数が存在することを理論式から明らかにした．このことから実際に本研究装置を用いて生細胞死細胞分離実験を行った．印加電場条件を $E = 50\text{V/mm}$, $f = 5\text{MHz}$ としたときの先鋭電極近傍における細胞操作の明視野様子を Fig.4.2.2 に示す．

印加前 0s の時，先鋭電極近傍には細胞が 5 個あるのが確認できる．印加 5s 後で先鋭電極先端部に 4 個の細胞の捕捉が確認できた．一方全く動いていない細胞が 1 個あることも確認できた．同様の細胞操作時における明視野と蛍光視野を合成した様子を Fig.4.2.3 に示す．先ほど印可 10s 後に先鋭電極先端部に捕捉された 4 個の細胞は蛍光を示しておらず，一方で全く動いていない 1 個の細胞は蛍光を示していることが分かった．蛍光を示したのは核染色蛍光色素 PI が細胞内の核に反応した為であり，膜損傷のある死細胞であることが判断できる．このことから先鋭電極に捕捉されたのは生細胞であり，捕捉されなかった細胞は死細胞であったことが分かった．理論的分離特性通りの誘電泳動力が生じており，生細胞と死細胞の分離が行えていることが確認できた．

印可周波数 f に対する生細胞と死細胞の分離精度を Fig.4.2.4 に示す．実験で使った細胞懸濁液の生細胞率は約 50%であったが，どの印可周波数 f においても 80%以上の精度で生細胞を捕捉した．印可周波数が低いほど死細胞を捕捉してしまう可能性が高いことが分かる．これは 4.2.1 で示したように $f=1\sim 3\text{MHz}$ では死細胞に対しても微小な正の誘電泳動力が働いている為，特に電場強度の高い先鋭電極先端部付近に位置した死細胞に捕捉するに十分な誘電泳動力が生じてしまったことが考えられる．しかしながら $f = 5\text{MHz}$ では，その影響も無視できるほどの精度で生死細胞分離が行えていることが分かった為，以降の本研究の細胞選別操作では印可周波数 $f = 5\text{MHz}$ を使用することとした．

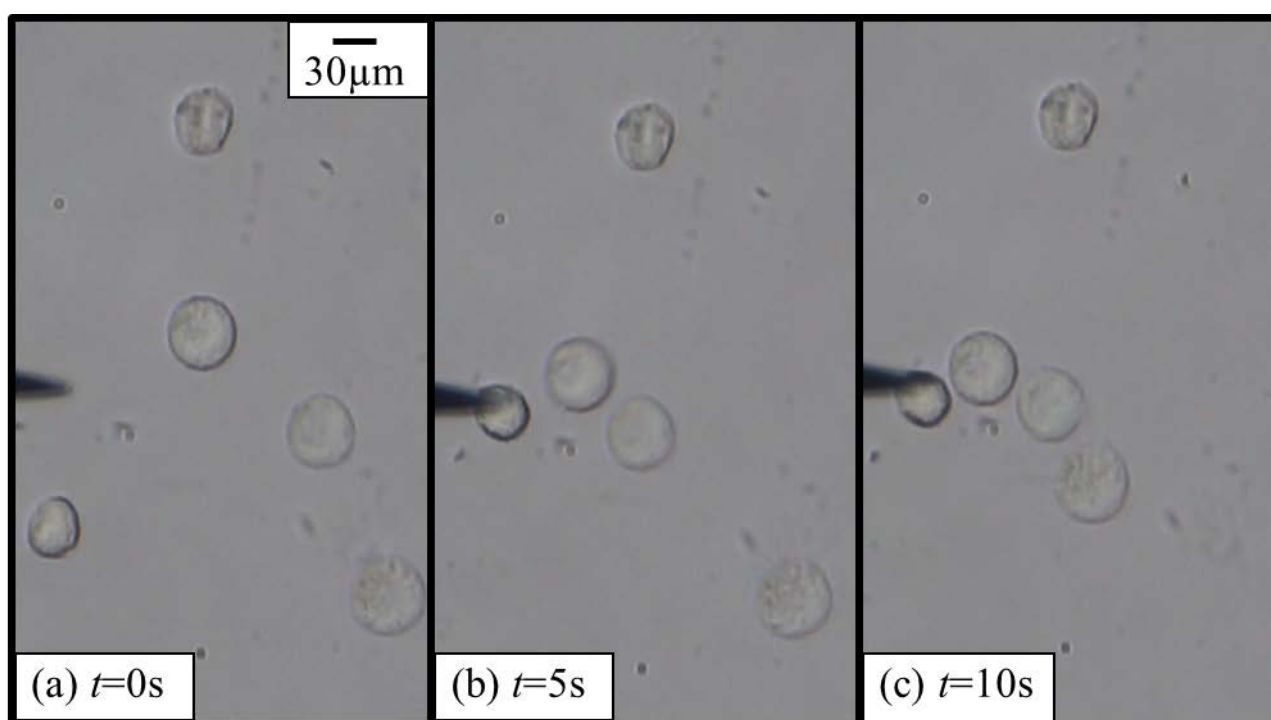


Figure 4.2.39 Separation of cells near sharp tip electrode
($E = 100V/mm$, $f = 5MHz$)



Figure 4.2.4 Separation of living cells and dead cells near sharp tip electrode, bright images (right) and fluorescence images (left)($E = 100\text{V/mm}$, $f = 5\text{MHz}$)

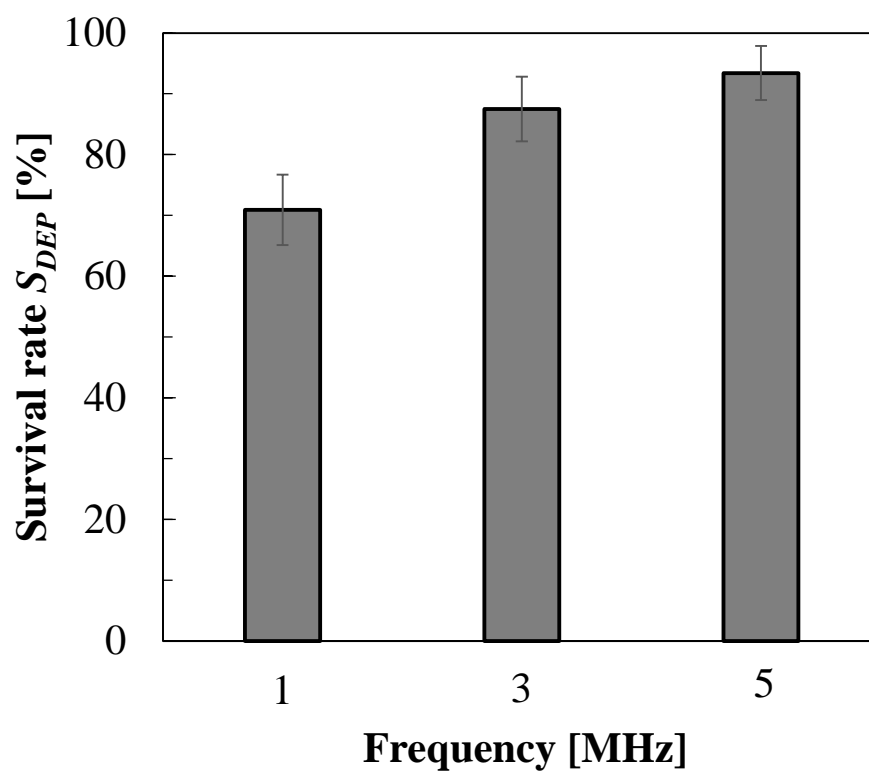


Figure 4.2.5 Viability of cells gathered to sharp tip of electrode

4.2.3 分離操作可能範囲

誘電泳動により捕捉可能となる範囲が本細胞操作の適用範囲と言い換えられる。Fig.4.2.5 に印可電場条件を $E = 25, 50 \text{ V/mm}$, $f = 5\text{MHz}$ での先鋭電極部先端部からの距離 l における捕捉成功率の関係を示す。先端部からの距離が近いほど捕捉成功率は高くなっており、電場強度が高い程誘電泳動力も大きく誘起される為、より距離の離れた位置の細胞も高確率に捕捉できた。各距離において捕捉できる細胞とできない細胞が存在する理由として、細胞膜の状態に個体差があり強い誘電泳動力を示すものや弱い誘電泳動力を示す細胞が存在することや、細胞径が多少異なり径の大きな誘電体には強い誘電泳動力が働くことによる誤差が挙げられる。この結果より、本細胞操作の適用範囲は印可電場強度 $E = 25 \sim 50\text{V/mm}$ により異なり、最大では電極先端部から約 $200\mu\text{m}$ の位置の細胞を高精度に捕捉可能であることが分かった。

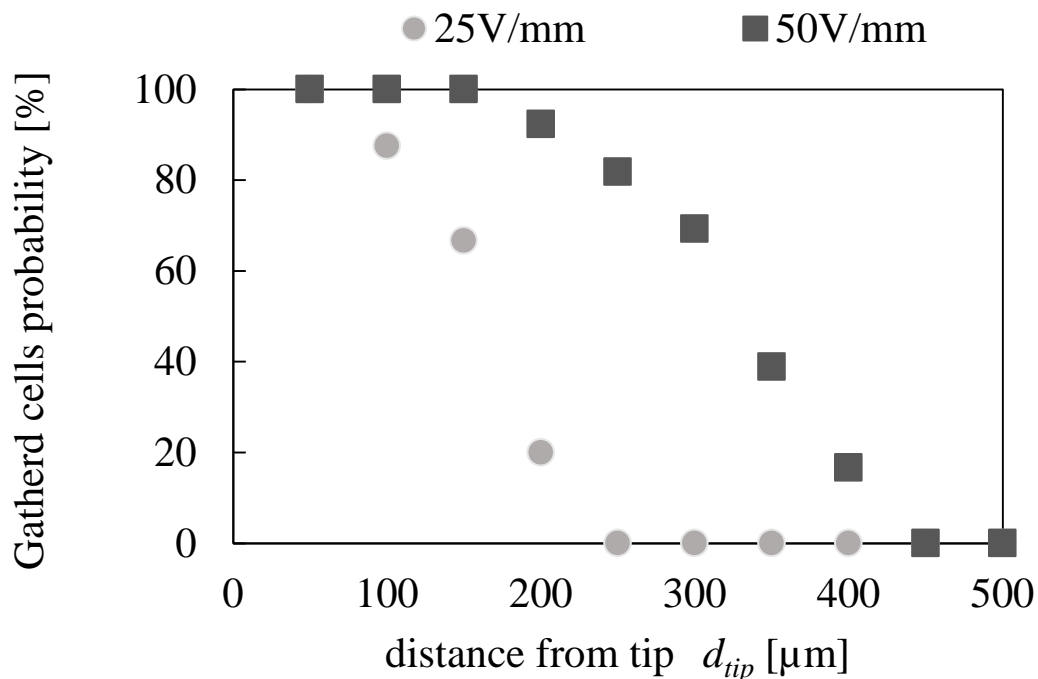


Figure 4.2.5 The range of gathered cells to tip of sharp electrode

4. 交流電気浸透流特性

4.3.1 誘起流による粒子挙動

本研究における安全域電場条件 [$E=25\text{V/mm}$, 100k, 500k, 1M, 3M, 5MHz], [$E=50\text{V/mm}$, $f=1\text{M}$, 3M, 5MHz] を使用し, 先鋭電極先端部極近傍に誘起された交流電気浸透流による蛍光ポリスチレン粒子挙動を蛍光観察した. 低電場強度 $E=25\text{V/mm}$ では, 全ての印可周波数条件 f においても粒子挙動はブラウン運動のみが観測され, 粒子を流動させるだけの交流電気浸透流は誘起されないことが分かった. 次いで高印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ では, $f=5\text{MHz}$ では低印可電場強度時と同様に交流電気浸透流による粒子運動は確認できなかったが, $f=1\text{M}$, 3MHz では電極先端部極近傍に位置する粒子が誘起された交流電気浸透流によって流動する様子が見られた. 印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ 印可周波数 $f=1\text{MHz}$ における 0.02 秒間の粒子挙動を Fig.4.3.1 に示す. Fig.4.3.1 では, $t=0\text{s}$ における電極先端部近傍に位置する 2 つの粒子を 0.01 秒毎に着目し, 流跡線を記した. $t=0\text{s}$ で電極側面部に位置する各粒子は, $t=0\sim 0.01\text{s}$ 間では電極先端部に引き寄せられるように移動し, $t=0.01\sim 0.02\text{s}$ 間では平板電極側へと移動した. これより電極側面部に位置した粒子は, 電極先端部まで電場勾配に沿って加速され流動していくことが分かった.

次いで, 印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ 印可周波数 $f=3\text{MHz}$ における 0.04 秒間の粒子挙動を Fig.4.3.2 に示す. $f=1\text{MHz}$ と類似した流跡線を示しているが, 計測時間が倍であるという事から誘起されている流速は $f=1\text{MHz}$ と比べると緩やかであることが分かる. これらの流動の様子は, 2.2 章で述べた低印可周波数における速度形成と類似しており, 高印可周波数においては形成範囲が電極先端部極近傍に限定されているものと考えられ, その要因は今後解明していくことが必要だと思われる.

これらの微小領域流動を物質輸送に用いる為に誘起されている流速を測定した。印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ 印可周波数 $f=1,3\text{MHz}$ における電極先端部[0, 0]での流速 U_{tip} を PTV 法により測定したものを Fig.4.3.3 に示す。前述した流蹟線から推測された速度差と同様に、低印可周波数条件である $f=1\text{MHz}$ の方が大きな流速を誘起していることが分かった。これは 2.2 章で示した理論式(2.2.2)からも分かるように、周波数が低い程誘起される流速が大きくなる現象に従っていることが分かる。この理論式に今回の印可周波数 $f=1,3\text{MHz}$ を当てはめると、理論上は $f=1\text{MHz}$ の流速 U_{tip} は $f=3\text{MHz}$ の約 2.7 倍と算出される。Fig.4.3.3 における流速比は約 2.5 倍であり、交流電気浸透流速度 U_{aceo} の理論式(2.2.1)に対し印可周波数 $f=1,3\text{MHz}$ を代入した際の速度比は 2.77 倍となり近い値を示すことから、この流動が交流電気浸透流によるものであると示唆された。

4.3.2 拡散速度との比較

交流電気浸透流が物質輸送に有用であることを検証するために、導入物質の拡散により移動する距離との比較を行った。物質がある点に集中しているところから、時間とともに拡散していく二次元拡散を考えた時、Fick の法則より求める二次元拡散方程式より、時間 t の間に移動する距離の 2 乗平均値 $\langle x_d \rangle^2$ を計算する。ただし PI の並進拡散定数 D は文献を参考にした⁽³⁴⁾

$$\langle x_d \rangle^2 = 4Dt = 4 \times (2.0 \times 10^{-10})t = 8.0 \times 10^{-10} \times t$$

前項で測定した交流電気浸透流速度 U_{tip} と比較をする為、一例として 1 秒間の平均移動距離の平方根を求めると

$$x_d = 27 [\mu\text{m}]$$

この移動距離は交流電気浸透流による物質輸送距離よりも低値となっており， $f=1\text{MHz}$ における流速 U_{ip} の約 10 分の 1， $f=1\text{MHz}$ における流速 U_{ip} の約 4 分の 1 であることが分かった．このことより，交流電気浸透流により誘起される流速 U_{ip} は物質拡散の移動距離を大きく上回る為，物質輸送手段として有用性があることが判明した．

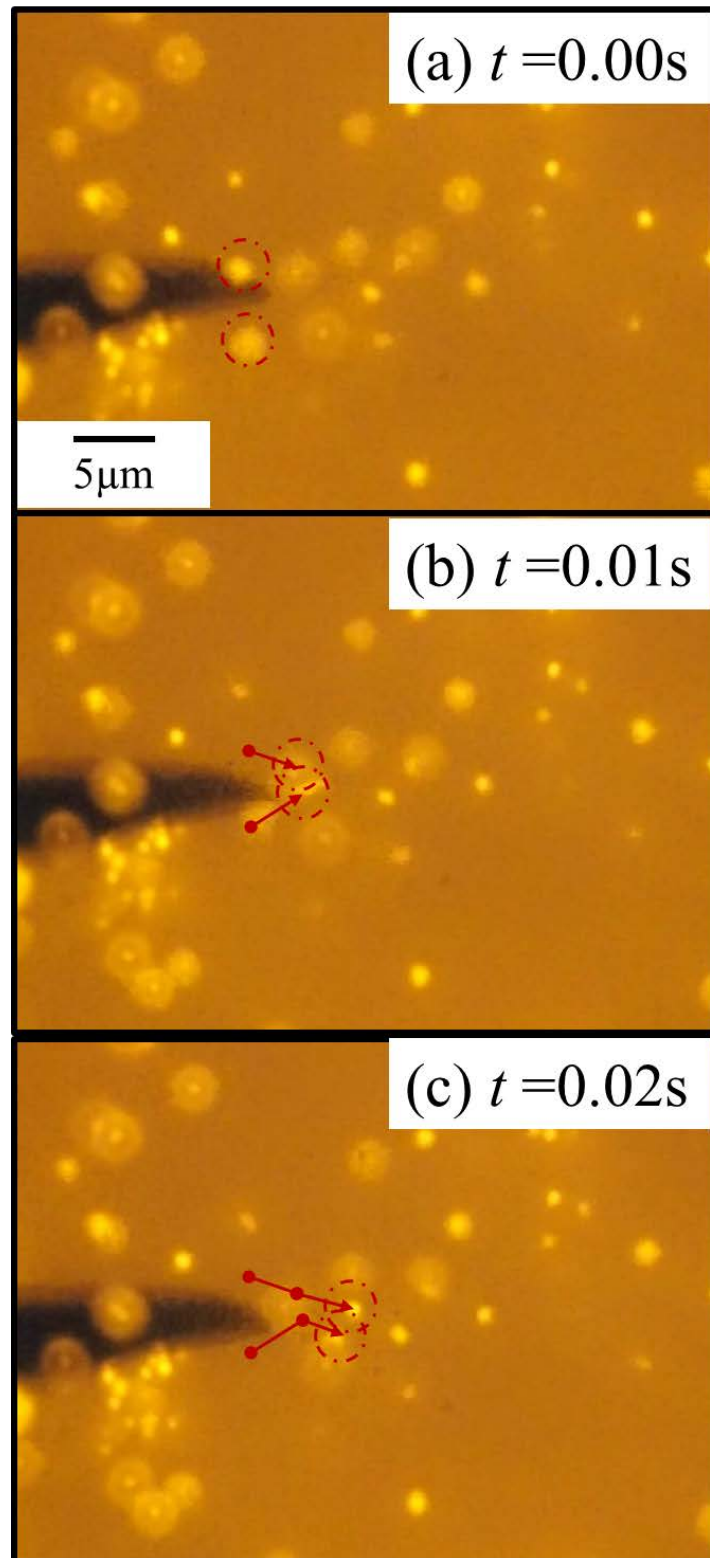


Figure4.3.1 Dynamics of particle in AC electro-osmotic flow ($E=50\text{V/mm}$, $f=1\text{MHz}$)

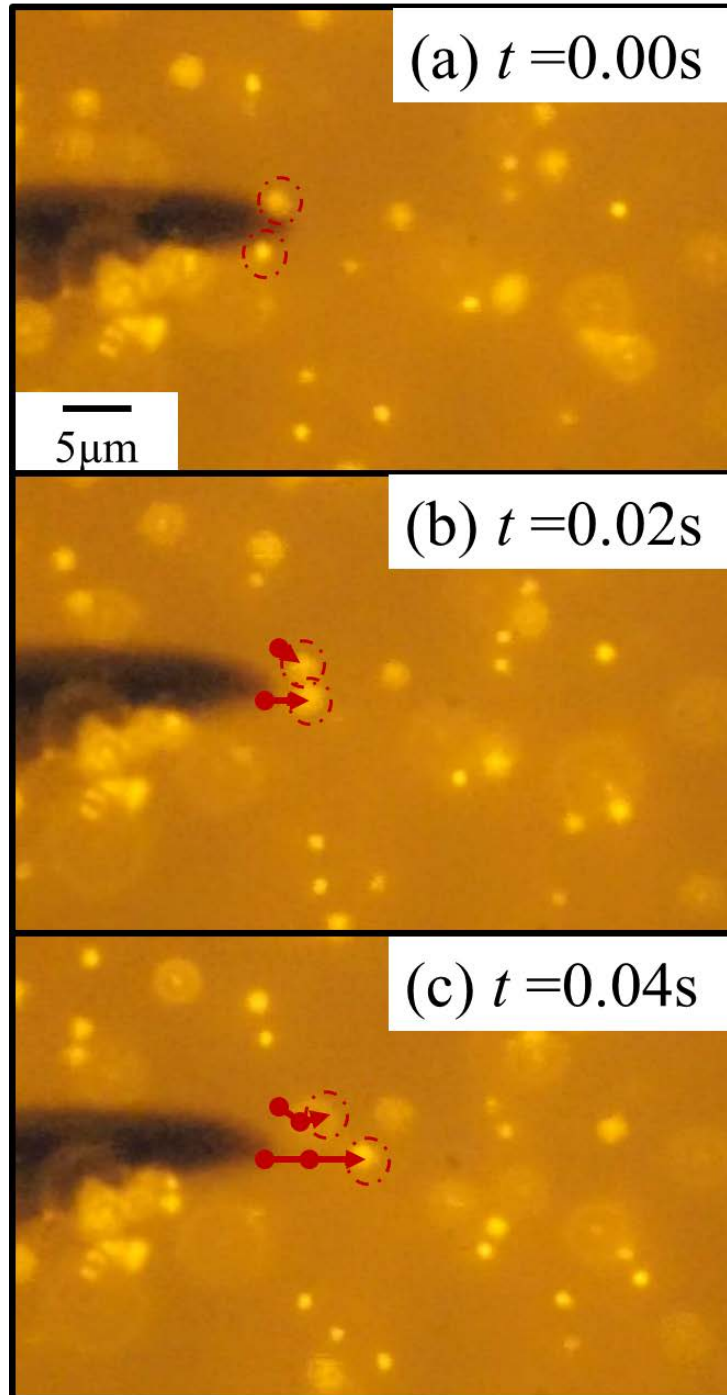


Figure 4.3.2 Dynamics of particle in AC electro-osmotic flow ($E=50\text{V/mm}$, $f=3\text{MHz}$)

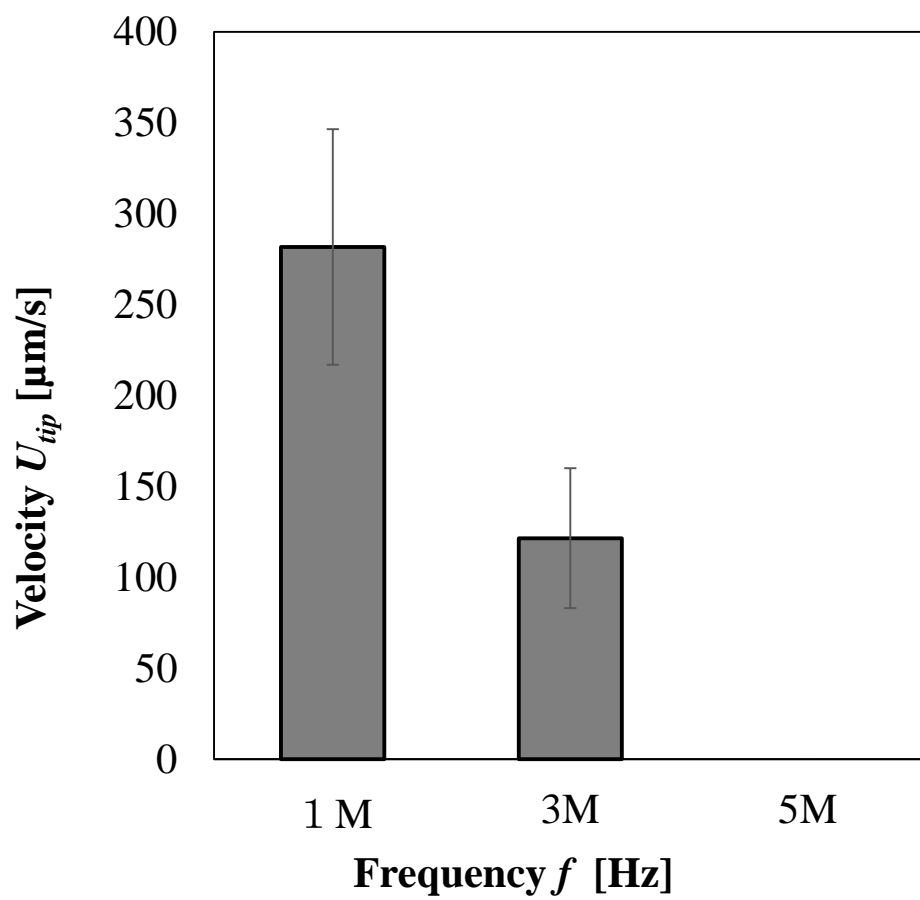


Figure 4.3.3 Velocity of tip generated by applied several frequency

4.4 局所電場エレクトロポレーション

不均一交流電場を使用するエレクトロポレーションの研究は行われてきたが(), 先鋭電極を使用した誘電泳動と局所電場エレクトロポレーションと交流電気浸透流を統合利用した研究は未だ行われていない為, 本研究における一連の細胞操作となる誘電泳動による細胞捕捉後の単一細胞への局所電場エレクトロポレーションの有用性, さらにエレクトロポレーション後の交流電気浸透流による積極的な導入物質輸送補助の有用性について検討を行った.

なお本章で細胞を捕捉かつ, 電極先端部に位置させるために誘電泳動による生細胞の捕捉を行った. 使用した電場条件は, 4.2 章で示した細胞に対し安全かつ細胞選別が優位に可能な印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$ 印加周波数 $f=5\text{MHz}$ を使用し, 低侵襲に細胞を電極先端部へと位置させた.

4.4.1 導入効率及び生存率

本実験では, 遺伝子物質 RNA の代用として用いた核蛍光染色物質 PI (propidium iodide) を本物質導入方法により細胞内へ導入し, 生細胞蛍光染色物質 calcein-AM により細胞の生存を確認する手法により, 物質導入効率 η_c 及び生存率 S_c を求めた. 安全な物質導入に成功した様子を Figure 4.4.1 に示す. 電極先端部に位置する 2 つの細胞は, 緑色励起光 $\lambda_{ex}=530\text{ nm}$ を照射することで物質導入が行われたことを意味する赤色蛍光 $\lambda_{em}=620\text{nm}$ を示し, 青色励起光 $\lambda_{ex}=490\text{ nm}$ を照射することで細胞内物質が漏れだしておらず, 細胞の生存を意味する緑色蛍光 $\lambda_{em}=515\text{ nm}$ を示している.

本局所エレクトロポレーションを使用した場合の物質導入の性能を評価する為, 印可パルス電圧における印可電場強度 $E=60\text{V/mm}$, 80V/mm , 100V/mm と変化させた場合の物質導入効率 η_c 及び生存率 S_c をパルス幅 $\Delta t=10\text{ms}$, 50ms , 100ms

の条件毎に Fig4.4.2~4 に示す．なお今回の印可パルス条件は、低導電性バッファーを使用したエレクトロポレーションで導入に成功した事例が報告されている条件を採用している⁽³¹⁾．Fig4.4.2 のパルス幅 $\Delta t=1\text{ms}$ 条件では、生存率 S_c はどの電場強度においても 80%を上回る高値であったが、導入効率 η_c は低値を示しており、導入が活発に行われるだけの膜穿孔が充分になされなかったことが考えられる．Fig4.4.3 のパルス幅 $\Delta t=50\text{ms}$ 条件では、印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ においてはパルス幅 $\Delta t=1\text{ms}$ 条件と同様の低導入効率であったが、印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ において高生存率かつ約 40%の導入効率を得られた．しかし、印可電場強度 $E=100\text{V/mm}$ では生存率 S_c が低値を示し、高電場強度によって不可逆性の膜穿孔がなされてしまったことが考えられ、印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ と 100V/mm の間に安全な膜穿孔を行える電場強度の閾値があることが判明した．Fig4.4.4 のパルス幅 $\Delta t=100\text{ms}$ 条件では、印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ でも生存率 S_c が低値となってしまう、パルス幅の増加に伴い不可逆性の膜穿孔がなされてしまったことが考えられる．本研究では生存率 S_c が 7 割を超えるものを安全な細胞操作と定義する為、 $[\Delta t=10\text{ms}, E=80\sim 100\text{V/mm}]$, $[\Delta t=50\text{ms}, E=60\sim 80\text{V/mm}]$, $[\Delta t=100\text{ms}, E=60\text{V/mm}]$ の各条件は安全に物質導入が行えた条件とされるが、可逆性の膜穿孔がなされていながら導入効率 η_c は低値となっており、導入の改善の余地があると考えられる．

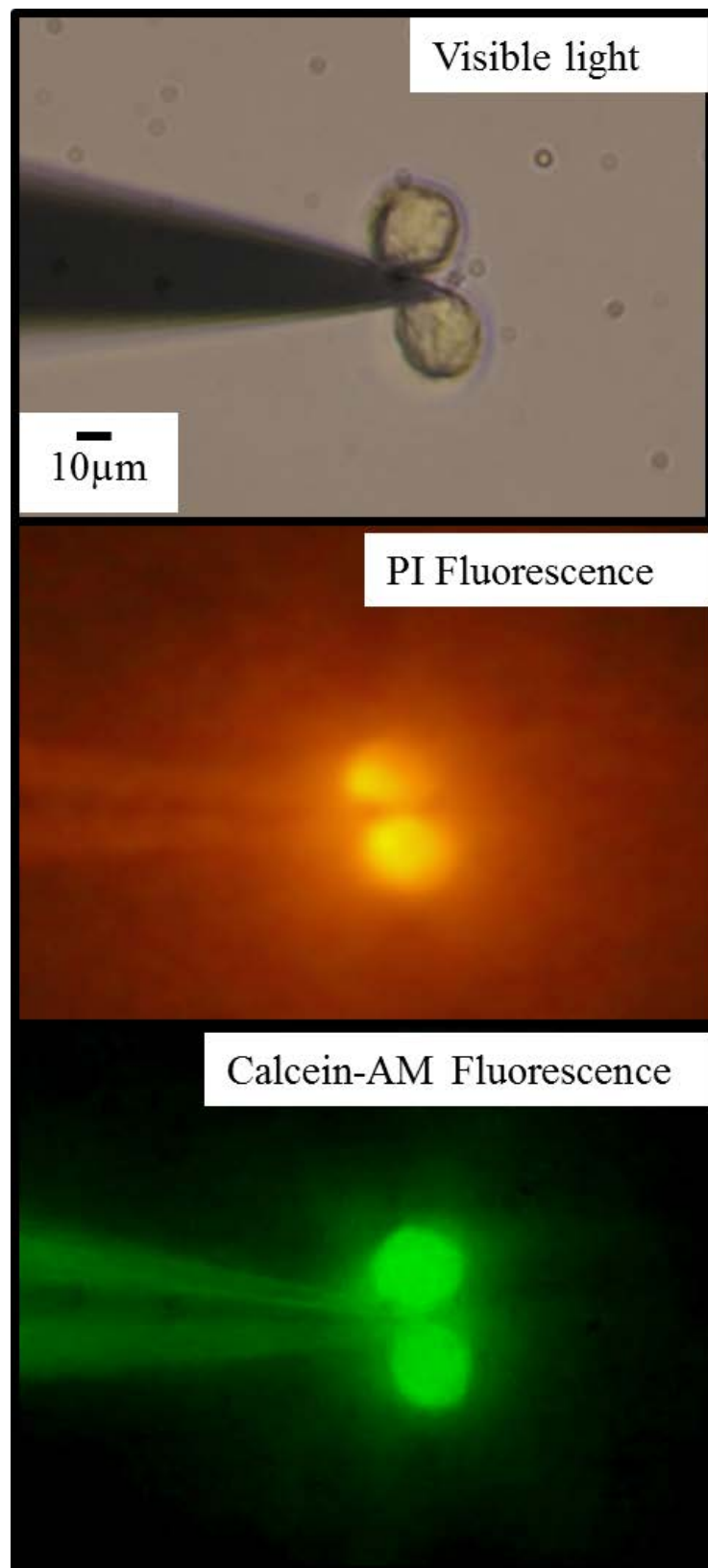


Figure 4.4.1 Visible light image and fluorescence images in success of injecting

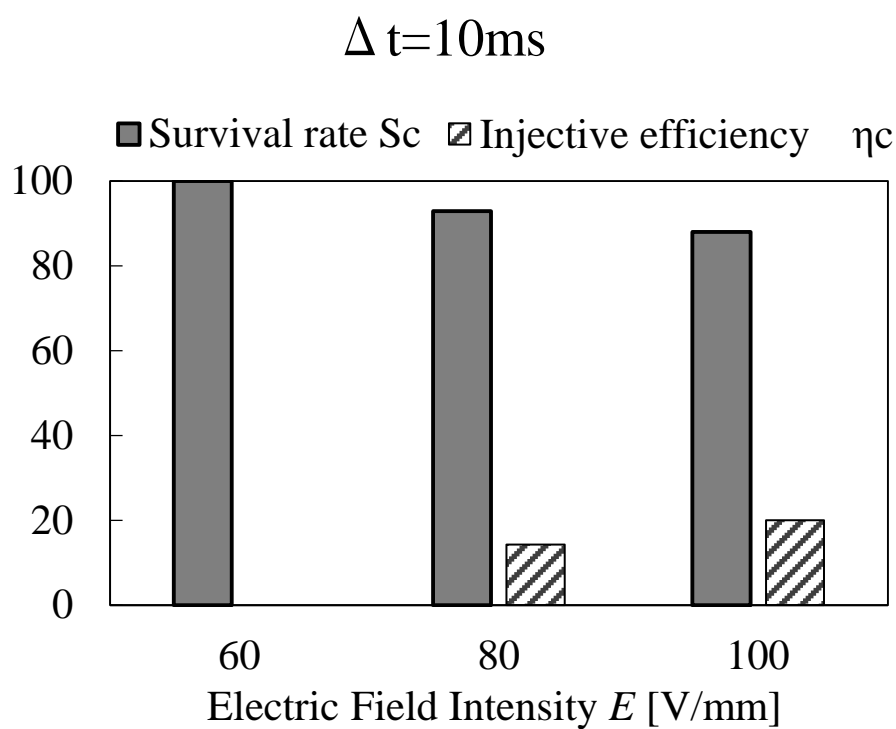


Figure 4.4.2 Survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=10\text{ms}$)

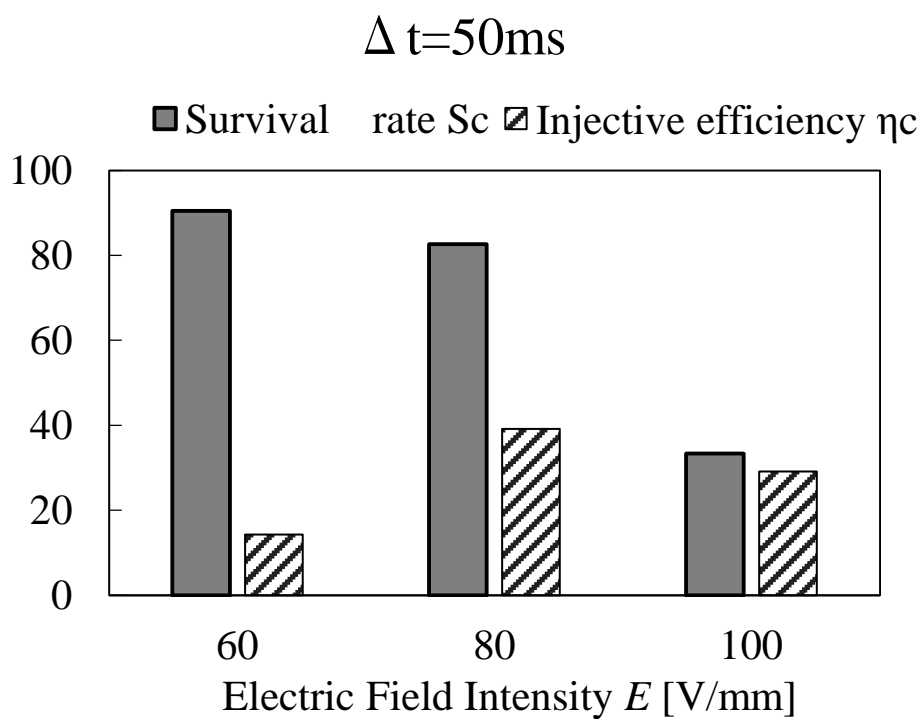


Figure 4.4.3 Survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=50\text{ms}$)

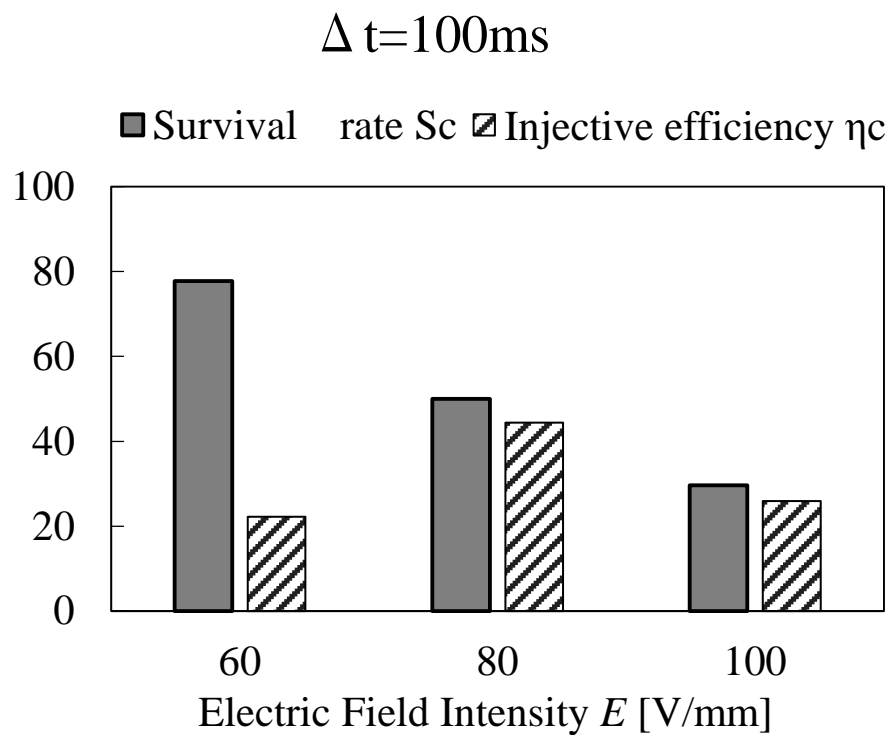


Figure 4.4.4 Survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=100\text{ms}$)

4.4.2 従来導入法との導入効率及び生存率の比較

本研究の局所電場エレクトロポレーションと従来手法の均一電場エレクトロポレーションの導入効率 η_c と生存率 S_c に着目して比較をした。同じ電場条件を使用しパルス幅 $\Delta t = 10\text{ms}, 50\text{ms}, 100\text{ms}$ の条件毎に印可電場強度 E と導入効率 η_c 及び生存率 S_c を比較した結果を Fig4.4.5~7 に示す。どの条件においても導入効率 η_c は従来手法との大きな差は見られなかったが、生存率 S_c が向上している条件がいくつか存在した。特に大きな差が見られたのは印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ の条件であり、パルス幅 $\Delta t=50\text{ms}$ では最大 40%以上の差が生じた。このことより、本研究の局所電場エレクトロポレーションが、従来手法の均一電場エレクトロポレーションに比べ同等効率の物質導入を低侵襲に行えることが明らかになった。

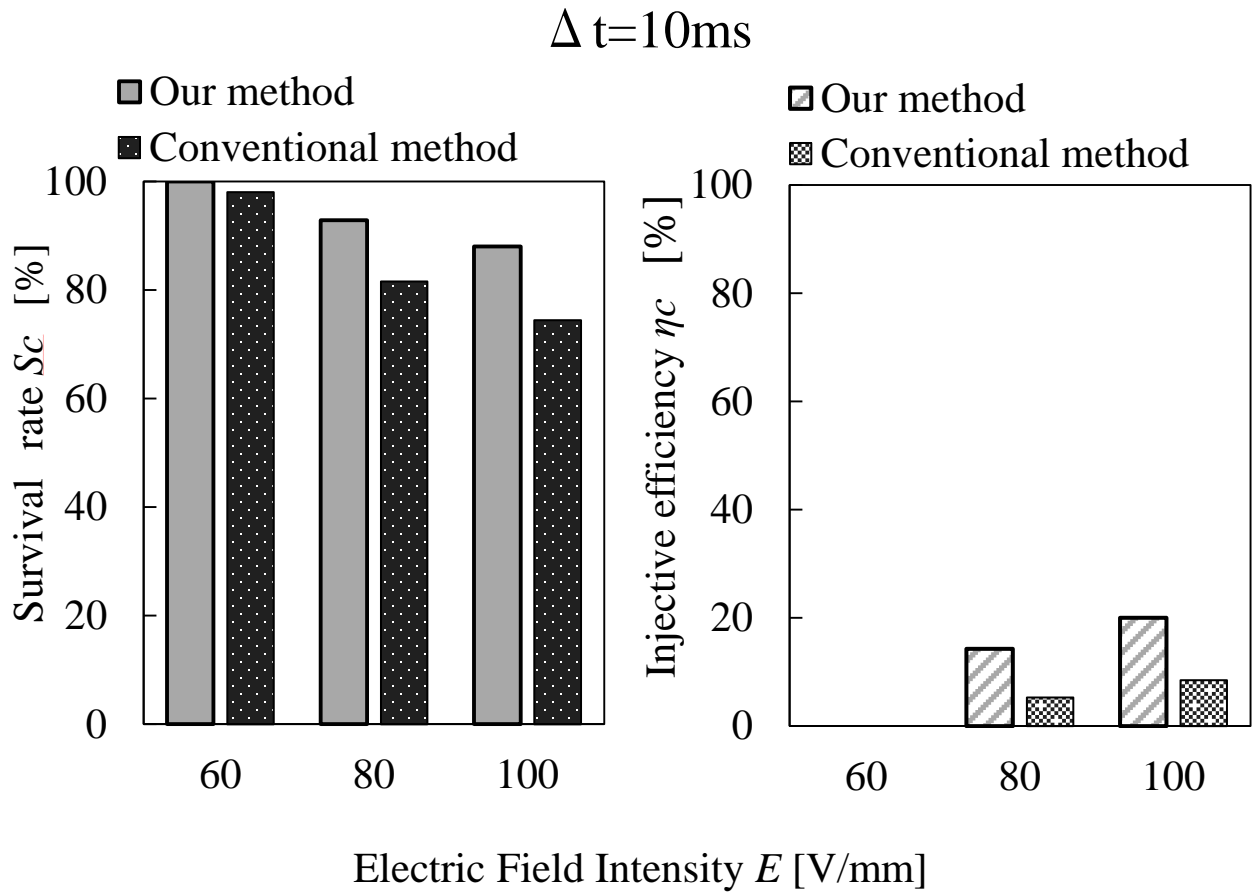


Figure 4.4.5 Comparison with conventional method of survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t = 10\text{ms}$)

$\Delta t=50\text{ms}$

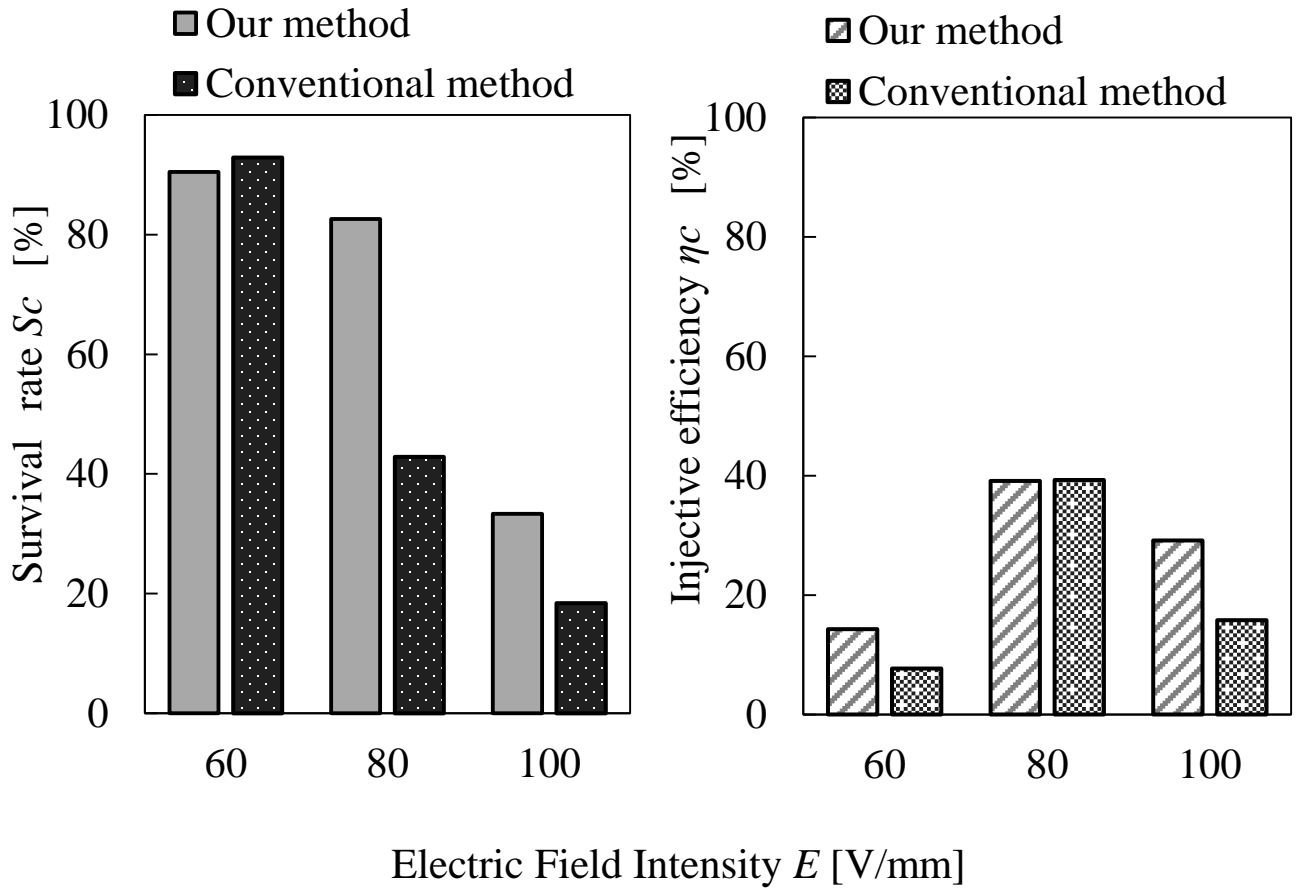


Figure 4.4.6 Comparison with conventional method of survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=50\text{ms}$)

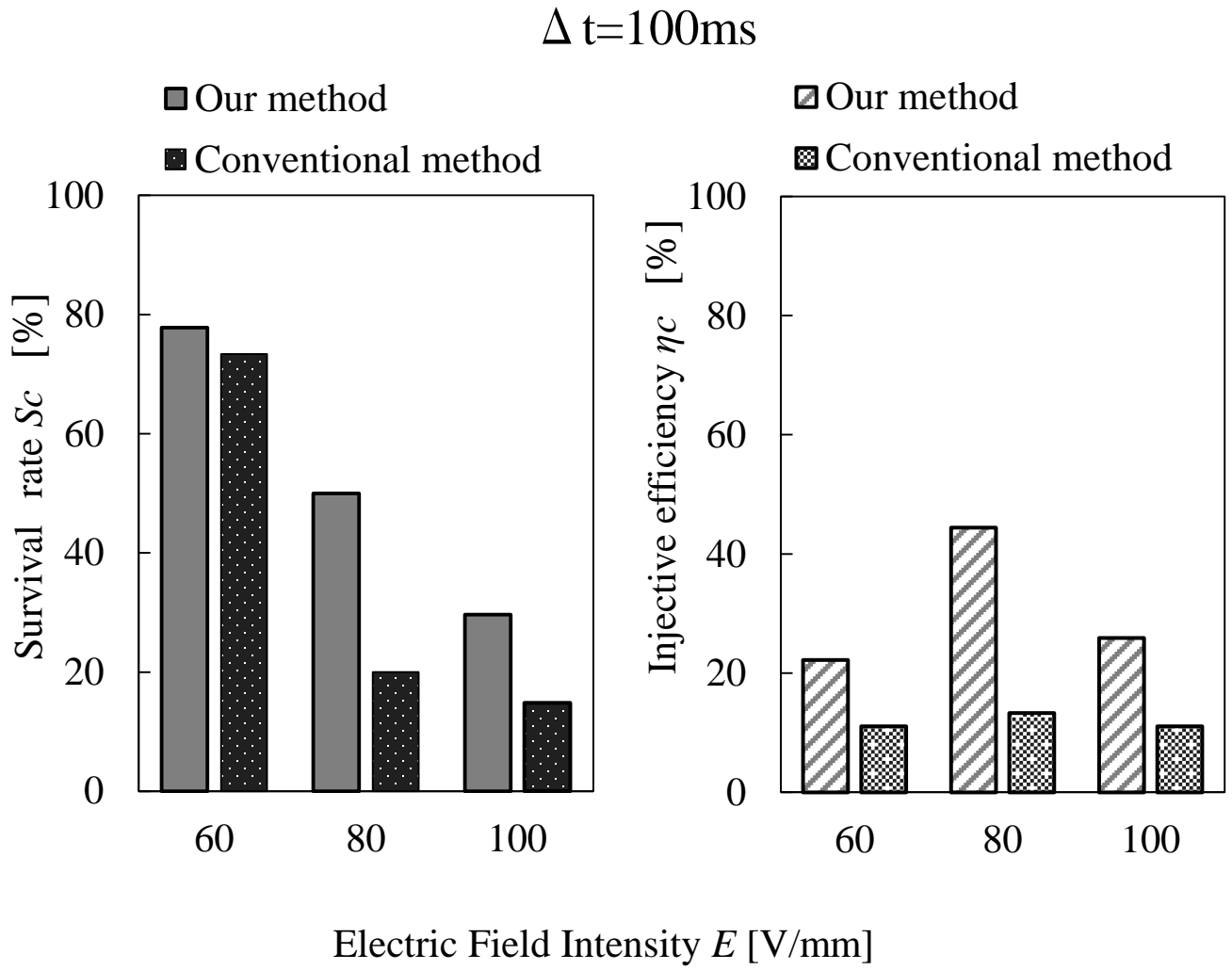


Figure 4.4.7 Comparison with conventional method of survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=100\text{ms}$)

4.4.3 蛍光導入の様相

局所電場エレクトロポレーションによる蛍光物質 PI の導入過程を蛍光観察した。印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ ，パルス幅 $\Delta t=50\text{ms}$ 条件における電場印加後 60 秒間の蛍光様相を Fig.4.4.8 に示す。 $t=5\text{s}$ 時，先鋭電極先端部と接触する部分に蛍光が観察され，PI が通過可能となる径を有する孔が生じたことが確認できた。これは電場解析において明らかにした，最も電場強度が集中している先鋭電極先端部であり，臨界膜電圧 V_c を上回った一部のみから導入が行われたことが判明した。 $t=30\text{s}$ 以降はその蛍光部から放射状に蛍光が細胞内に広がっていき PI が細胞内で拡散されたことが確認できた。

電極座標系 $Y=0$ 断面における電場印可後 30 秒毎の蛍光強度と電極先端部からの距離 X の関係を Figure4.4.9 に示す。PI 蛍光強度からみても分かるように， $t=30\text{s}$ 時では先鋭電極先端部の $X=0$ から強い蛍光が生じ始め，細胞の端部一点のみから PI が導入されたことが示された。その後は他の部位から PI が導入された蛍光は現れず， $X=0$ 部の導入点から次第に強度を増しながら細胞全域へと広がった。このことより，蛍光強度分布に着目することで電場強度の集中する先鋭電極先端部近傍に位置する一部分のみが膜穿孔されたことが明らかになった。

細胞内における PI 蛍光の広がりを拡散現象であることを確認する為，各 $t=10,30,60,90,120,150,180\text{s}$ における最大蛍光強度の分布を時間の平方根を横軸にとって Fig.4.4.10 示した。各プロットの一次近似曲線上にほとんど位置しており，拡散距離が時間の平方根と比例関係にあることと類似している為，細胞内における蛍光の広がりには PI の拡散現象によるものであると確かめられた。一方，原点から最初の時刻距離 ($t=10\text{s}$, $t^{1/2}=3.16$) を繋いだ直線と先の一次近似曲線とは傾きが異なり， $t=10\text{s}$ 前は PI の細胞内拡散現象とは異なる速度で広がっている。これは物質が孔を通過する物質輸送の際の速度等が含まれている為だと思われる。

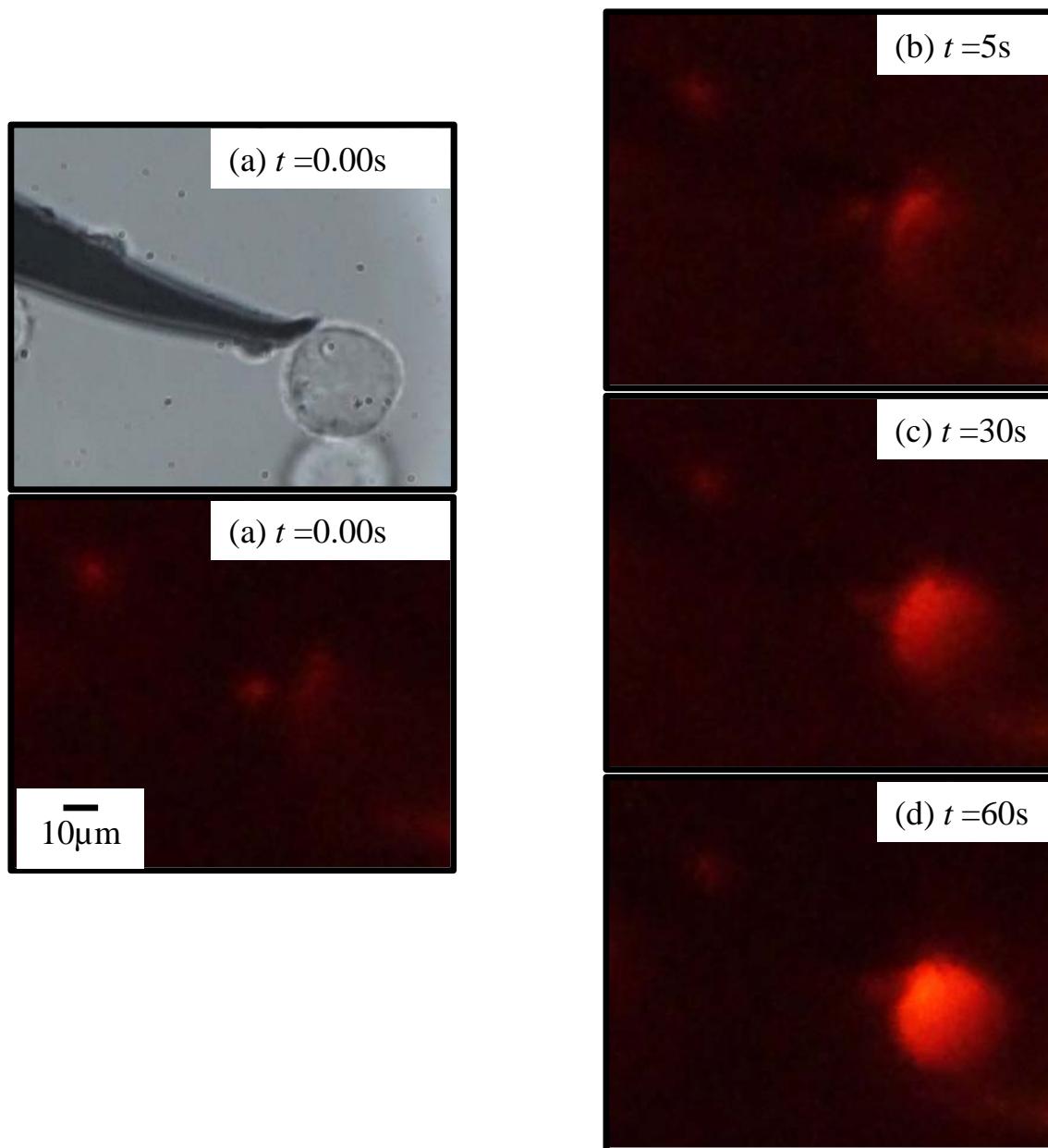


Figure 4.4.8 Dynamics of PI injecting by local EP

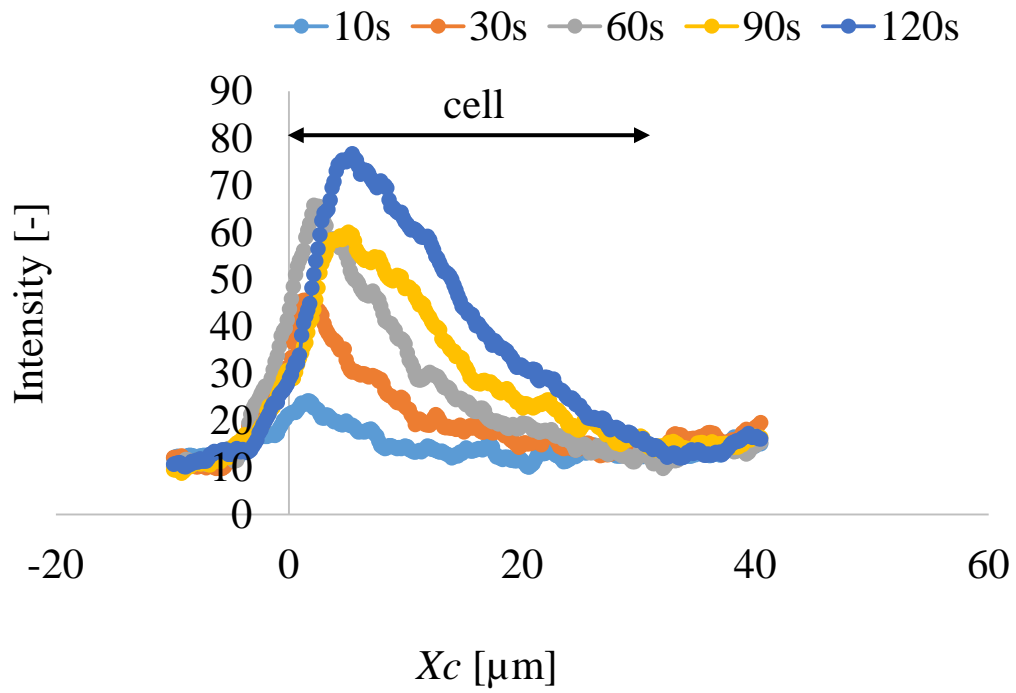


Figure 4.4.9 Distribution of PI intensity in every 30 seconds

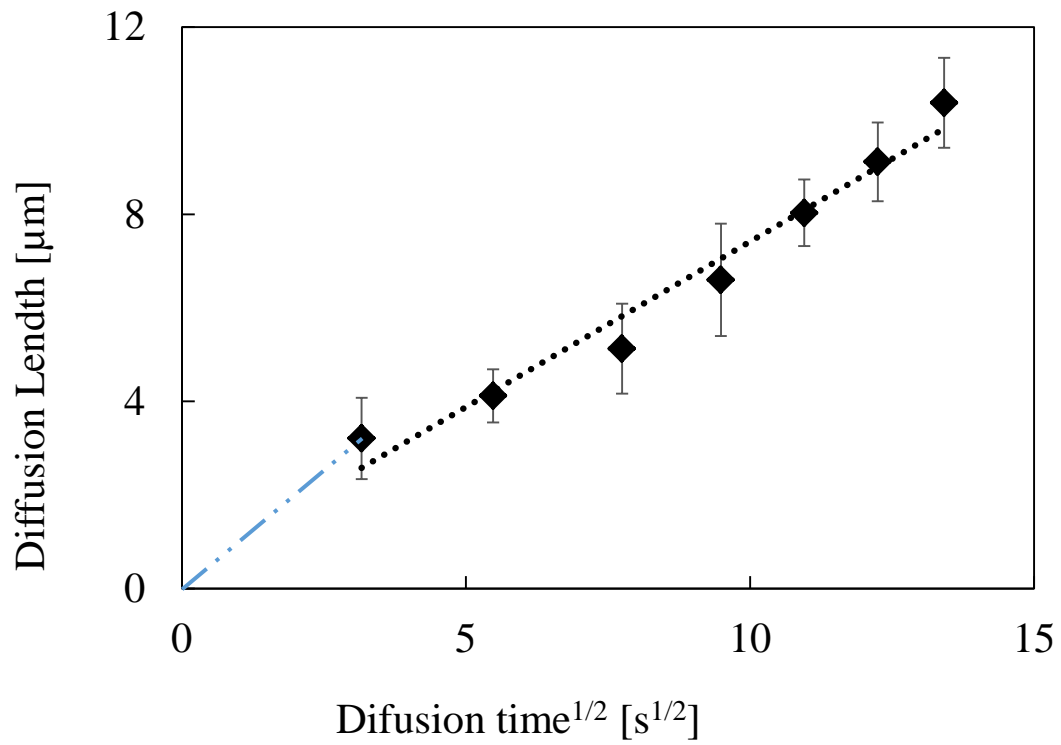


Figure 4.4.1010 Relationship between diffusion length and diffusion time

4.4 蛍光導入位置

蛍光物質の孔内輸送が行われた直後と考えられるパルス電場印可後 10 秒後、最大蛍光強度を示した位置の分布を Fig4.4.11 に示す。最大蛍光強度の位置は電極先端部との接触点[0, 0]周りに集中していることが分かる。この分布は最も電気力線が集中し電場強度の高値を示す先鋭電極先端部

PI が導入された点の蛍光強度は時間を増す毎に増強されていくことが Fig4.4.9 で明らかになった為、印可直後に最大蛍光強度を示す部位は最初に導入がなされた蛍光導入位置とみなすことができる。したがって、印可後 10 秒後の最大蛍光強度分布より最も電場強度が集中している先鋭電極先端部から蛍光物質が孔内へと輸送されていることがこの分布からも考えられる。

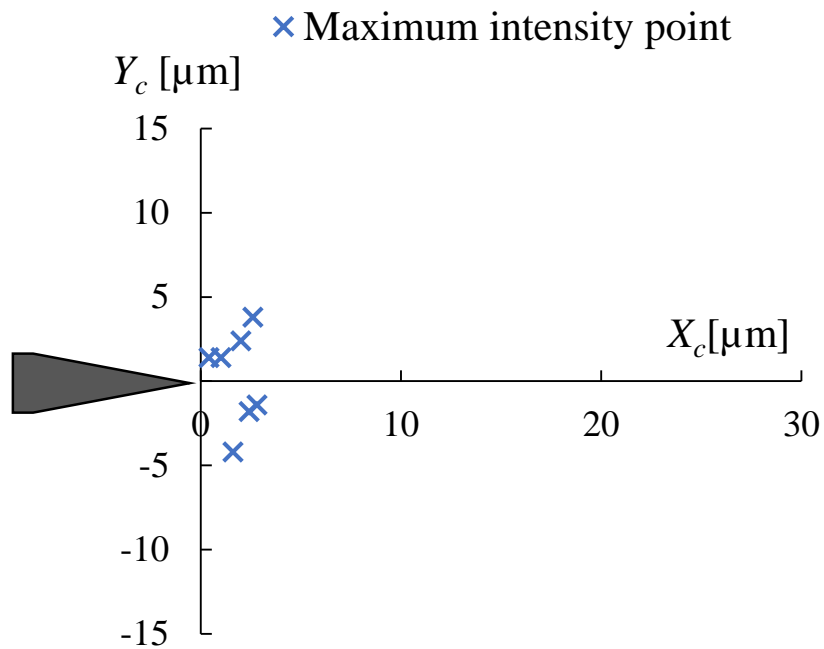


Figure 4.4.11 Distribution of PI maximum intensity points

4.4.5 細胞円周部の開孔部率

蛍光物質の孔内輸送が行われた直後と考えられるパルス電場印可後 10 秒後における細胞円周部の蛍光に着目することで、パルスにより生じる開孔径を間接的に推測できると考えた。そこで本項では細胞円周部の蛍光を占める割合を開孔径と仮定し、均一電場エレクトロポレーションと局所電場エレクトロポレーションの開孔部率を比較した。

最初に、従来 EP 手法である 2 対の平板電極における PI 導入の様子を把握するために、局所電場エレクトロポレーション同様に印可電場強度 $E=80\text{V/mm}$ 、パルス幅 $\Delta t=50\text{ms}$ 条件における電場印加後 60 秒間の蛍光様相を Fig.4.4.12 に示す。 $t=10\text{s}$ 時、電場の向きと並行する細胞の両極部に蛍光が観察され、PI が通過可能となる径を有する孔が生じたことが確認できた。これは前述した均一電場下に

における誘電体の電気力線図 2.31 における、電気力線が最も密になっており電場強度が強くなっている両極部であることが考えられる。t=30s 以降は当該技術同様に、その蛍光部から放射状に蛍光が細胞内に広がっていき PI が細胞内で拡散されたことが確認できた。電場の向きと並行し細胞の中心を通る Y=0 断面における電場印可後 30 秒毎の蛍光強度と細胞中心からの距離 X の関係を Figure4.4.14 に示す。PI 蛍光強度からみても分かるように、t=10s 時から細胞の両極部から強い蛍光強度が見られ、t=30s 以降はその蛍光強度が増強されていき、最初に蛍光が見られなかった細胞中心部にまで拡散していった様子が確認できる。両極部以外から PI が導入された蛍光は現れず、電場強度の集中する細胞の両極部が膜穿孔されたことが確認できた。

従来手法による均一電場エレクトロポレーションと本研究の局所電場エレクトロポレーションによる細胞円周部の蛍光分布を Fig.4.4.15 に示す。均一エレクトロポレーションが二つの蛍光ピークを示しているのに対し、局所電場エレクトロポレーションではただ 1 つの蛍光ピークのみを示している。このことから局所電場エレクトロポレーションの方が少ない膜穿孔量によって導入が行われていることが考えられる。各蛍光ピークはやや均一電場エレクトロポレーションの方が強い蛍光強度となっており、孔が大きく生じたことや孔が多く生じたことなどが考えられる。Fig.4.4.15 に示した蛍光強度分布における PI 蛍光強度 40 以上を示した円周部の割合を開孔部率 P_c と定義し、各手法の開孔部率 P_c と生存率を Fig.4.4.16 に示す。開孔部率 P_c で比較すると局所電場エレクトロポレーションは約 3 分の 1 以下の開孔部率 P_c となっており、従来よりも少ない穿孔量で導入が行えたことが分かった。さらに、生存率では約 2 倍増加していることから、開孔部率 P_c が生存率 S_c に大きく影響していることが考えられる。したがって、4.4.2 章で述べた局所電場エレクトロポレーションによる物質導入が均

一電場エレクトロポレーションに比べて低侵襲であった理由は、局所電場を使用することにより膜穿孔が生じている開孔部が減少した為に、不可逆とならず生存しやすかったことが判明した。

しかしながら、均一電場エレクトロポレーションにも局所電場エレクトロポレーションにはない 1 つの細胞に多量の物質導入を行えるという利点がある。実際に遺伝子導入操作の現場で活用される場合に導入量が多量に必要な場合には、局所電場エレクトロポレーションの方が有用であることも考えられ、使用する場合によって適宜使い分けることになると考えられる。

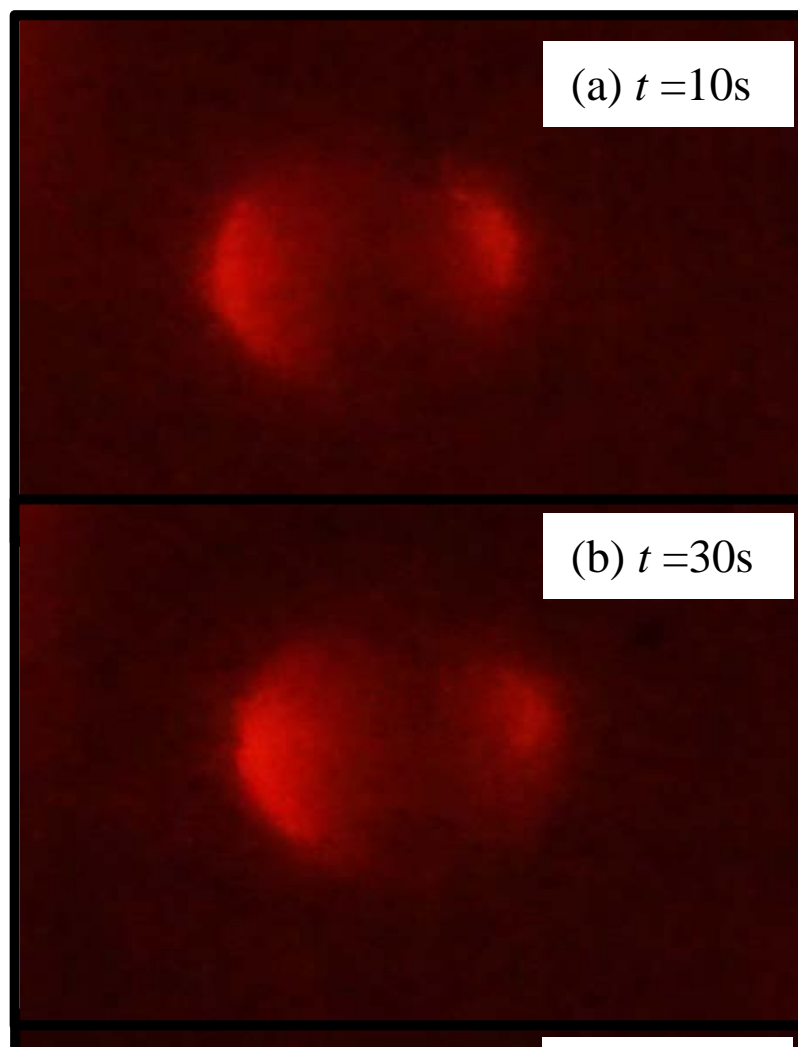


Figure 4.4.11 Dynamics of PI injecting by uniformity EP

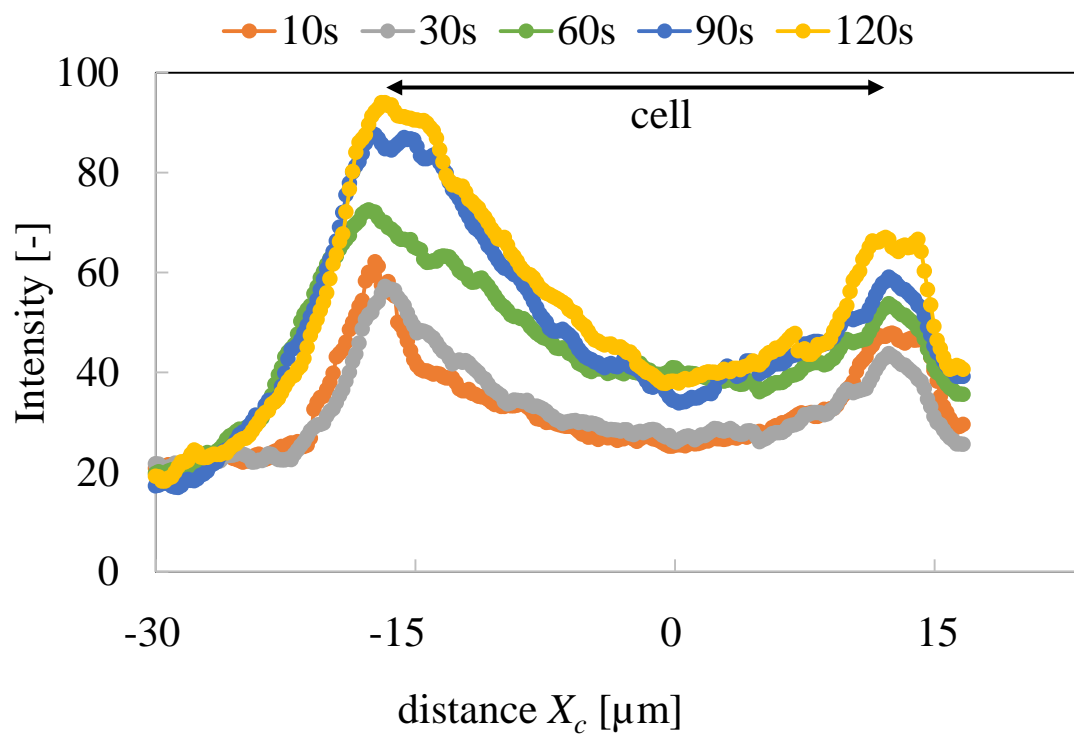


Figure 4.4.12 Distribution of PI intensity in every 30 seconds

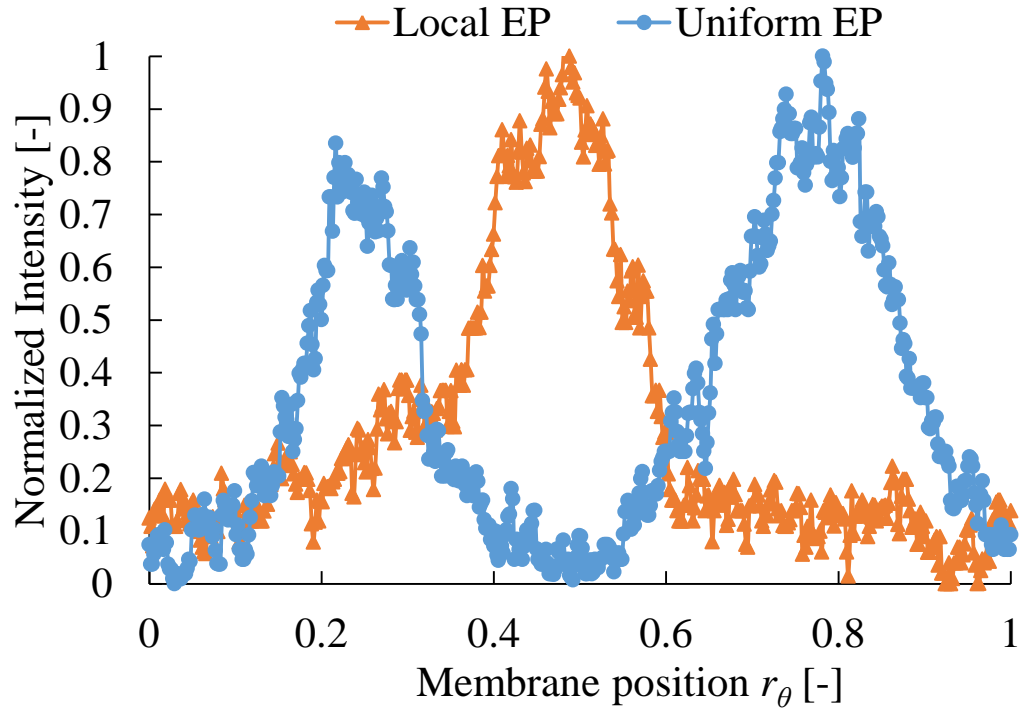
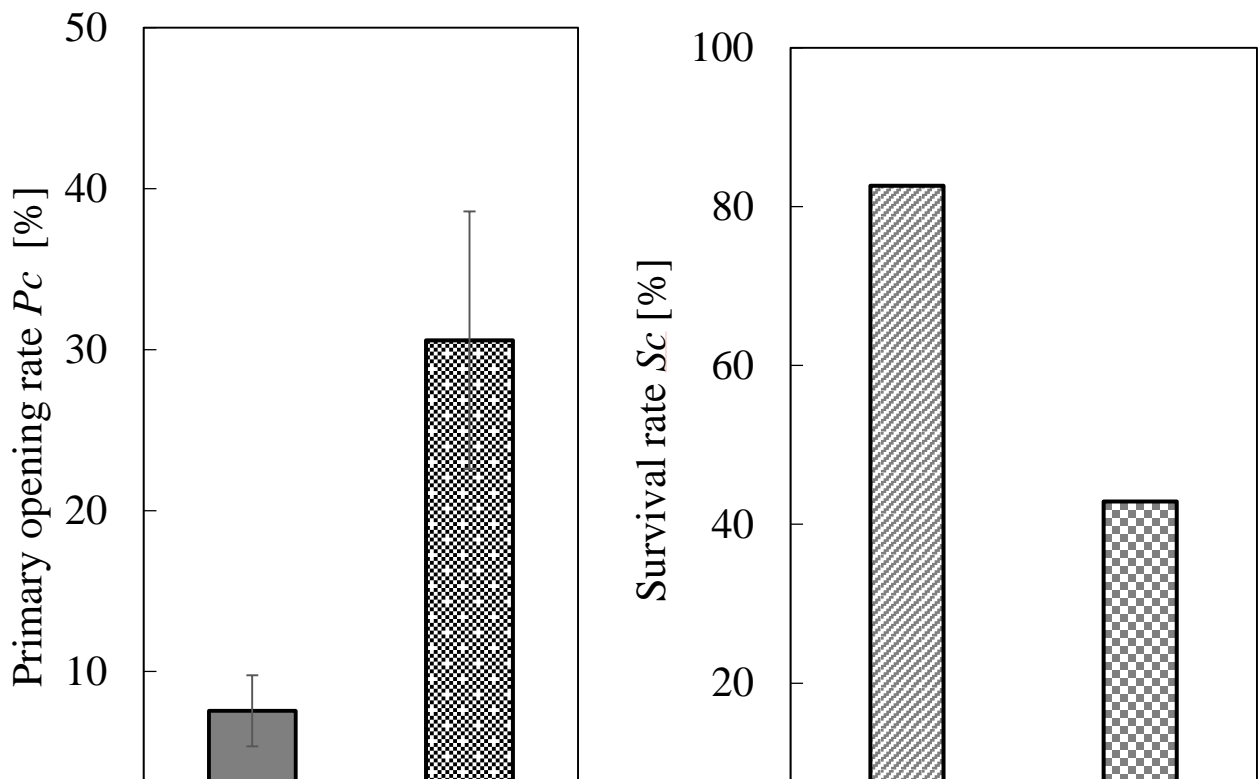


Figure 4.4.13 Distribution of PI intensity in circumference section



non-uniformity EP uniformity EP non-uniformity EP uniformity EP

Figure 4.4.14 Relationship between primary opening and survival rate in each EP

4.4.6 物質輸送による導入促進効果

本細胞操作における局所電場エレクトロポレーションによる膜穿孔と交流電気浸透流による導入物質輸送を統合利用した物質導入プロセスの評価を行った。パルス電場条件 $E=60, 80, 100\text{V/mm}$, パルス幅を $\Delta t=10\text{m}, 50\text{m}, 100\text{ms}$ と変化させた際の導入効率と細胞生存率を Fig.4.4.17~20 に示す。物質輸送に使用した交流電気浸透流の条件は最も細胞に安全かつ拡散現象以上の輸送が期待できる条件である, 印可電場強度 $E=50\text{V/mm}$, 印可周波数 $f=3\text{MHz}$ の条件であり, 電極先端部速度 $U_{tip}=112\mu\text{m/s}$ を利用可能となっている。Fig.4.4.17~20 において, どの条件も生存率は交流電気浸透流の有無に影響はなかった。導入効率において差が見られたのが, $[\Delta t=50\text{ms}, E=60, 80\text{V/mm}]$, $[\Delta t=100\text{ms}, E=60\text{V/mm}]$ の各 3 条件であり, 中でも Fig.4.4.18 に示す $\Delta t=50\text{ms}$, $E=80\text{V/mm}$ では, 生存率と導入効率が共に 7

割を上回る優れた物質導入が行えた。交流電気浸透流を使用しない場合では、膜穿孔は行われているものの導入がなされなかった細胞が数多く存在していたのに対し、交流電気浸透流による物質輸送を用いることで膜穿孔が行われた細胞に対して確実に物質を輸送することに成功していると考えられる。Fig.4.4.18 に示す $\Delta t=50\text{ms}$, $E=60\text{V/mm}$ と Fig.4.4.1 に示す $\Delta t=100\text{ms}$, $E=60\text{V/mm}$ では、交流電気浸透流を使用しない場合では導入がほとんど行われない低電場強度の条件であったが、交流電気浸透流を使用することで双方とも倍以上の導入効率を得られ、従来は電場強度が低いために孔数が少量であることや孔径が小さいことなどで導入が困難であった条件であっても、物質輸送を用いることで物質導入を充分に行えることが可能となった。

一方で生存率は高値であるが導入効率が低値を示した条件も存在し、今回の物質輸送力では導入促進が困難なほど孔の径が小さいか、孔の継続時間が短かったことが考えられる。この条件に対して、現在はパルス印可の後に研究者の手によって即座に交流電場を印可するようにスイッチングしているが、仮にこのスイッチングの間に孔が閉鎖してしまっていたとすれば、今後電源をトリガー入力接続により同時印可可能にすることで改善されると思われる。

従来のエレクトロポレーションでは導入効率と細胞生存率が二律背反の関係にあることが課題点であり、どちらも高値を示す手法が求められている。本エレクトロポレーションプロセスでは局所エレクトロポレーションにより細胞への負荷が軽減され細胞生存率が向上し、交流電気浸透流による導入物質輸送により物質の導入を促進し導入効率を向上することに成功した。

$\Delta t=10\text{ms}$

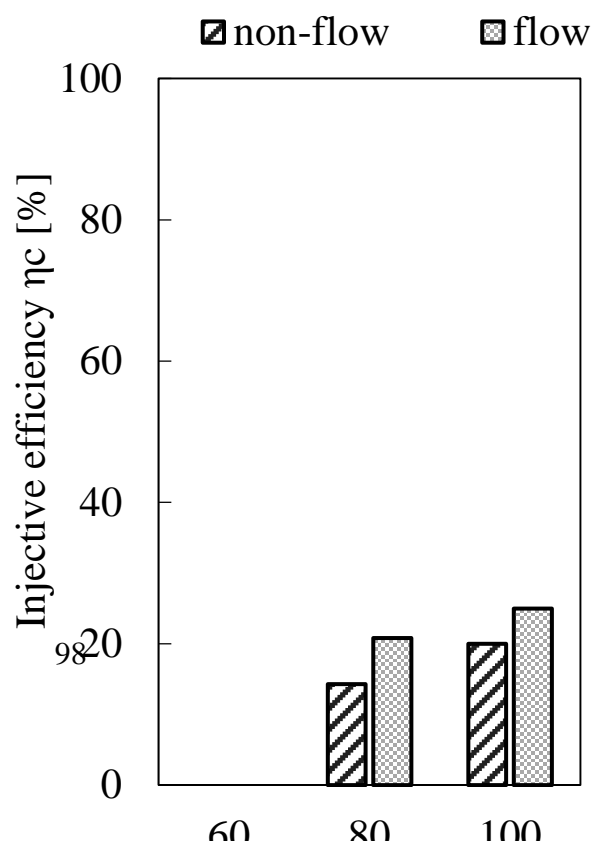
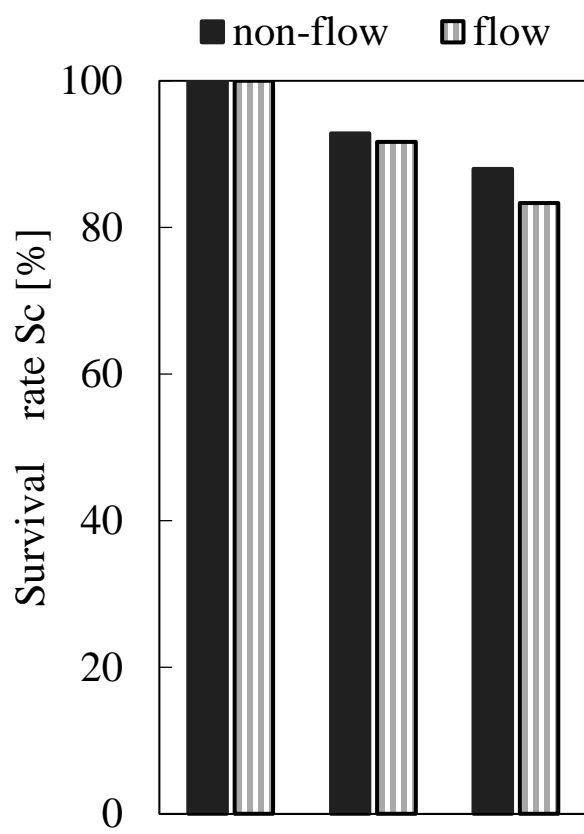


Figure 4.4.15 Comparison with using AC electro-osmosis of survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=100\text{ms}$)

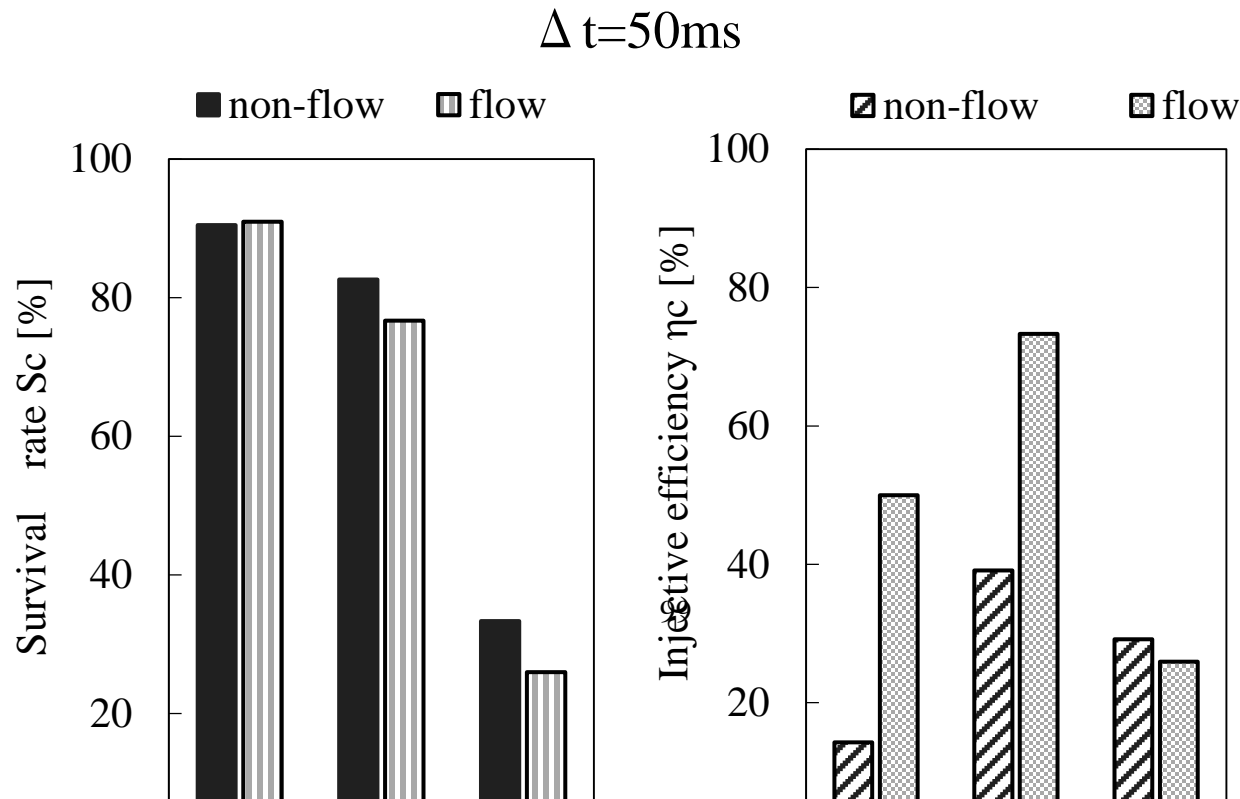


Figure 4.4.16 Comparison with using AC electro-osmosis of survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=50\text{ms}$)

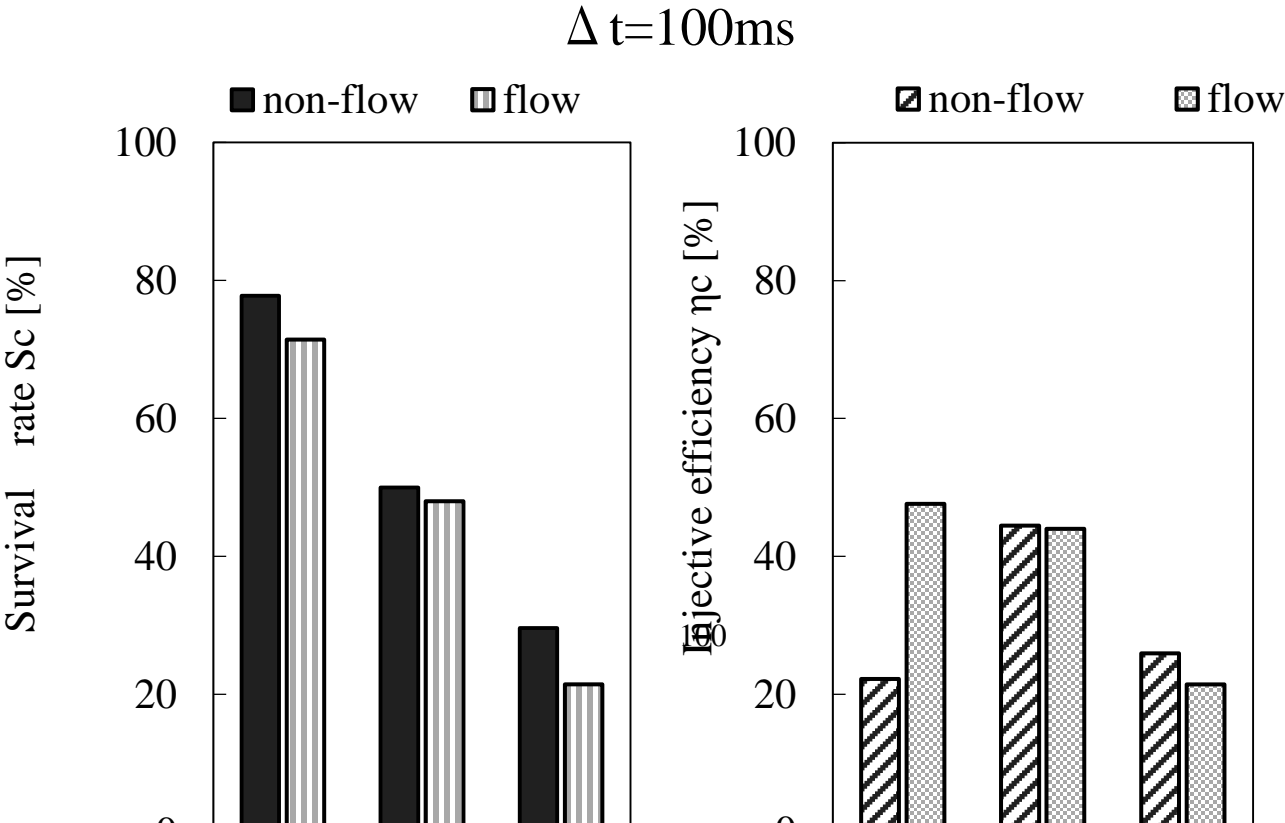


Figure 4.4.17 Comparison with using AC electro-osmosis of survival rate and injecting efficiency in several electric field intensity ($\Delta t=50\text{ms}$)

5 結論

1. 交流電場下における細胞への影響を様々な電場条件で観測し、電場印可後の細胞径に着目することで、本細胞操作時において細胞に影響のない安全域電場条件を定めた。
2. 本細胞操作時に選択的細胞選別を可能とする根拠を誘電泳動法の理論式から示し、実際に高周波数電場印可により生細胞を高精度に選択的捕捉可能であることを示した。
3. 高周波数電場印可による交流電気浸透流は先鋭電極先端部極近傍に誘起されていることを明らかにし、その流速を粒子追跡により明らかにした。また、電極先端部に誘起される流速と分子拡散による移動幅を比較することで、交

流電気浸透流が分子拡散を上回る物質輸送を行えることを示した.

4. 先鋭電極を用いた局所電場エレクトロポレーションが従来手法の均一電場エレクトロポレーションに比べ, 電場印可後生存率が高値を示し低侵襲に導入が行われたことを示した. また, 核染色蛍光色素を用いたリアルタイムイメージングによる蛍光導入の様相に着目し, 細胞膜部の蛍光部を孔が生じている開孔部と定めることで, 低侵襲な物質導入が行われた要因を示した.
5. 局所電場エレクトロポレーション後に交流電気浸透流による物質輸送を適用することで, 物質輸送を行わない導入法と比べて高効率な導入が行われていることを示した. これらのことより, 誘電泳動, 局所電エレクトロポレーション, 交流電気浸透流を統合利用した本導入方法が従来のエレクトロポレーションに比べ, 低侵襲かつ高効率な物質導入が可能であることを明らかにした.

謝辞

本論文は首都大学東京大学院 理工学研究科 機械工学専攻における 2016 年 4 月から 2018 年 2 月までの研究成果をまとめたものである.

本研究を進めるにあたり, 首都大学東京大学院 理工学研究科 機械工学専攻 小原弘道准教授, 水沼博前教授には終始懇切丁寧な御指導及び御鞭撻を頂き, 深く感謝致しますと共に厚く御礼申し上げます.

二年間の研究生活な中で共に研究に励み, 互いに議論し, 多くの意見を頂いた

伊藤哲也学士，森井湧太学士の皆様に深く感謝致しますと共に，研究以外の日常生活においても共に有意義な時間を過ごす事が出来ました事を心から嬉しく思います．

参考文献

- (1) T.ALLEN，細胞基礎から細胞治療まで科学のとびら，東京化学同人，2012
- (2) Enosawa, Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source for hepatocytes, Liver Transplantation. 20,391-393, 2014
- (3) 麓伸太郎，非ウイルスベクターによる臓器・部位・細胞選択遺伝子導入法に関する研究，YAKUGAKUZASSHI, Vol. 29(9), 1055-1061, 2009
- (4) Thomas Wirth , Nigel Parkerb, Seppo Ylä-Herttuala : History of therapy, Gene 525 pp.162–169, 2013
- (5) Niidome T, Huang L. : Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, Gene Ther (24):pp.1647-1652. 2002
- (6) Schenborn ET, Goiffon V. : DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. Meth Mol Biol, pp.130:147–153. 2000
- (7) Tae Kyung Kim¹ and James H. Eberwinecorresponding: Mammalian cell transfection: the present

- and the future, *Anal Bioanal Chem* 397.; pp.3173–3178. 2010
- (8) Marshall E.: *Science* 286, pp.2244-2245, 1999
 - (9) U. Zimmermann: *Targeted Drugs*, E. Goldberg, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 153, 1983
 - (10) E. Neumann, M. Schaefer-Ridder: Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1, 841 (1982) .
 - (11) H.P. Schwan :*Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation* Springer US, Boston, MA (1983), 10.1007/978-1-4684-4253-3
 - (12) M. Tarek: Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation *Biophys. J.*, 88 (2005), pp. 4045-4053,
 - (13) T. Kotnik, G. Pucihar, M. Rebersek, D. Miklavcic, L.M. Mir Role of pulse shape in cell membrane electroporation *Biochim. Biophys. Acta*, 1614, pp. 193-200, 2003
 - (14) Lee, W.G.; Demirci, U.; Khademhosseini, A. Microscale electroporation: Challenges and perspectives for clinical applications. *Integr. Biol.* 2009, 1, 242–251. [Google Scholar] [CrossRef]
 - (15) 宮田昌悟, 小松祥堯 : 誘電泳動特性に基づく軟骨細胞の分化・脱分化の形態の識別, *臨床バイオメカニクス学会誌*, Vol. 32, pp.21-26, 2011
 - (16) H.Morgan , N.G. Green, *AC Electrokinetics : colloids and nanoparticles* Research Studies Press, 2003
 - (17) J.Voldman, *Electrical Forces for Microscale Cell Manipulation*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol.8, pp.425–54, 2006.
 - (18) H. A. Pohl, The Motion and Precipitation of Suspensions in Divergent Electric Fields, *Journal of Applied Physics*, Vol. 22, pp. 869-872, 1951
 - (19) H. A. Pohl, Continuous dielectrophoretic separation of cell mixtures, *Cell Biophys*, Vol.1, 15-28, 1979
 - (20) 尼子恵里, 圓城寺隆治, 内田諭, 朽久保文嘉 : 誘電泳動インピーダンス計測法を応用した熱損傷菌の代謝評価に関する基礎検討. *電気学会論文誌 E* 128, pp.499-504, 2008
 - (21) Ramos, A., Morgan, H., Green, N.G., Castellanos, A., AC Electric-Field-Induced Fluid Flow in Microelectrodes, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 217, pp.420-422 ,1999
 - (22) Castellanos, A., Ramos, A., González, A., Green, N.G., Morgan, H., Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: Scaling laws , *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol.36, No.20, pp. 2584-2597, 2003
 - (23) Velev, O.D., Gangwal, S., Petsev, D.N., Particle-localized AC and DC manipulation and electrokinetics , *Annual Reports on the Progress of Chemistry - Section C*, Vol.105, pp. 213-246, 2009
 - (24) J.Voldman, *Electrical Forces for Microscale Cell Manipulation*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol.8,

425–54, 2006.

- (25) Green, N.G., Ramos, A., González, A., Morgan, H., Castellanos, A., Fluid flow induced by non-uniform AC electric fields in electrolytes on microelectrodes. I. Experimental measurements, *Physical Review E*, Vol.61,4011-4018, 2000
- (26) Martin L. Yarmush,1,2 Alexander Golberg.etc : Electroporation-Based Technologies for Medicine, *Annu. Rev. Biomed*, pp.295-320. 2014
- (27) Eberhard Neumann : Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, pp3-16.1999
- (28) 黒木登志夫, 宮崎正博, 樽松美治: 培養細胞実験ハンドブック, 羊土社, pp.65~80, 2004
- (29) Heiko Mussauer, Vladimir L. Sukhorukov : Trehalose Improves Survival of Electrotransfected Mammalian Cells, *Cytometry* 45, pp.161-169. 2001
- (30) J. Kojima, H. Shinohara, Y. Ikariyama, et.al: Electrically controlled proliferation of human carcinoma cells cultured on the surface of an electrode, *Journal of Biotechnology*, vol.18, pp.129-139, 1991.
- (31) S.Movahed, Dongqing Li : Microfluidics cell electroporation, *Microfluid Nanofluid* vol.10, pp70-734, 2011
- (32) Damien Voyera, Aude Silve : Dynamical modeling of tissue electroporation, *Bioelectrochemistry* 119, pp.98-110, 2018
- (33) C Chen1, J A Evans, M P Robinson : Measurement of the efficiency of cell membrane electroporation using pulsed ac fields, *Institute of Physics and Engineering in Medicine* vol.53, 2008
- (34) Sheng-Chieh Chen.et all: Delivery of molecules into cells using localized single cell electroporation on ITO micro-electrode based transparent chip, *Biomedical Microdevices* vol.14, pp.811-817, 2012